

ANTIBODIES

Publication number: JP2003515323 (T)

Publication date: 2003-05-07

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: *G01N33/50; A61K38/43; A61K39/395; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/00; C07K14/47; C07K16/18; C07K16/28; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/08; G01N33/15; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/50; A61K38/43; A61K39/395; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/00; C07K14/435; C07K16/18; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/08; G01N33/15; G01N33/53; G01N33/566; (IPC1-7): C12N15/09; A61K38/43; A61K39/395; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/00; C07K14/47; C07K16/18; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/08; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566*

- European: C07K16/28

Application number: JP20010538975T 20001113

Priority number(s): WO1999GB03859 19991118; GB20000003527 20000215; GB20000005071 20000302; WO2000GB04317 20001113

Also published as:

 WO0136486 (A2)
 WO0136486 (A3)
 US2006014222 (A1)
 US7074909 (B2)
 EP1242456 (A2)

more >>

Abstract not available for JP 2003515323 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0136486 (A2)**

The use of an ScFv Ab (ScFv Ab) capable of recognising a disease associated molecule (DAM) in the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of a disease condition associated with a DAM is described. The ScFv Ab has therapeutic, diagnostic and prognostic applications.

.....
 Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	T 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/43		45/00	4 B 0 2 4
39/395		48/00	4 B 0 6 4
45/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
48/00		C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 135 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-538975(P2001-538975)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月13日(2000.11.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年5月20日(2002.5.20)
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 0 0 / 0 4 3 1 7
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 3 6 4 8 6
 (87) 国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)
 (31) 優先権主張番号 P C T / G B 9 9 / 0 3 8 5 9
 (32) 優先日 平成11年11月18日(1999.11.18)
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)
 (31) 優先権主張番号 0 0 0 3 5 2 7 . 9
 (32) 優先日 平成12年2月15日(2000.2.15)
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 オックスフォード バイオメディカ (ユー
 ケイ) リミテッド
 イギリス国 オーエックス4 4 ジーエー
 オックスフォード、ザ オックスフォード
 サイエンス パーク、ロバート ロビン
 ソン アベニュー、メダワー センター

(74) 代理人 弁理士 奥山 尚一 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 体

(57) 【要約】

疾患関連分子 (D A M) 関連病態の予防および／または
 治療用の薬物製造における、疾患関連分子 (D A M) を
 認識することができる S c F v 抗体 (S c F v A b) の
 使用を記載する。S c F v 抗体は治療、診断、および予
 後に適用される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 疾患関連分子（DAM）に関連する病態の予防および／または治療のための薬物の製造における疾患関連分子（DAM）を認識することができるS c F v抗体（S c F v A b）の使用。

【請求項2】 前記DAMが腫瘍関連抗原（TAA）である請求項1に記載のS c F v抗体の使用。

【請求項3】 前記S c F v抗体が、配列番号1または配列番号2に示した配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有する請求項1または請求項2に記載の使用。

【請求項4】 前記S c F v抗体が、配列番号3に示した配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有する請求項1または請求項2に記載の使用。

【請求項5】 前記S c F v抗体が、配列番号4に示した配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有する請求項1または請求項2に記載の使用。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載のS c F v抗体をコードするヌクレオチド配列。

【請求項7】 前記ヌクレオチド配列が、配列番号5または配列番号6に示した配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有する請求項6に記載のヌクレオチド配列。

【請求項8】 前記ヌクレオチド配列が、配列番号7に示した配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有する請求項6に記載のヌクレオチド配列。

【請求項9】 前記ヌクレオチド配列が、配列番号8に示した配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有する請求項6に記載のヌクレオチド配列。

【請求項10】 請求項6～9のいずれか1項に記載のヌクレオチド配列にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列または前記ハイブリッド形成可能なヌクレオチド配列に相補的な配列。

【請求項 1 1】 前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結した請求項 6～1 0 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 1 2】 請求項 6～1 1 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列を含む構築物。

【請求項 1 3】 請求項 6～1 2 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 1 4】 請求項 6～1 3 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列を含むプラスミド。

【請求項 1 5】 請求項 6～1 4 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【請求項 1 6】 請求項 6～1 1 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列を発現させるステップまたは請求項 1 2～1 5 のいずれか 1 項に記載の発現構成要素に存在する場合にヌクレオチド配列を発現させるステップと、任意選択的に S c F v 抗体を単離および／または精製するステップとを含む請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の S c F v 抗体の調製方法。

【請求項 1 7】 請求項 1 6 に記載の方法によって産生された S c F v 抗体。

【請求項 1 8】 (i) 各ファージが潜在的な結合ドメインを含むタンパク質をコードする核酸構築物を含むファージライブラリーを調製するステップと、

(i i) 前記潜在的タンパク質を発現させて、ファージの外側表面上に潜在的結合ドメインをディスプレイさせるステップと、

(i i i) 前記潜在的結合ドメインと D A M 標的とが相互作用するような条件下でファージライブラリーと D A M 標的とを接触させるステップと、

(i v) D A M 標的に結合していないファージから D A M 標的に結合するドメインをディスプレイしているファージを分離するステップと、

(v) D A M 標的に結合するタンパク質を外側表面上にディスプレイしている少なくとも 1 つのファージを回収するステップと、

(v i) 結合タンパク質をインビトロで増幅させて、結合構造の第 2 の濃縮されたライブラリーを作製するステップと、

(v i i) ステップ (i i i) ~ (v i) を少なくとも2回繰り返すステップと、

(v i i i) インビトロ条件下で前記結合タンパク質をコードする核酸を発現させるステップと、

(i x) 前記結合タンパク質がDAMと相互作用するかどうかをシグナルの有無によって同定するステップと、

を含む前記請求項のいずれか1項に記載のS c F v抗体のインビトロ獲得方法。

【請求項19】 インビトロ獲得方法が疾患治療に有用なS c F v抗体をスクリーニングすることである請求項18に記載のインビトロ法。

【請求項20】 (a) 請求項18または請求項19に記載のインビトロ法を行なうステップと、

(b) 検出可能なシグナルによってDAMを認識することができる1つまたは複数のS c F v抗体を同定するステップと、

(c) 一定量の1つまたは複数の前記S c F v抗体を調製するステップとを含む方法。

【請求項21】 (a) 請求項18または請求項19に記載の方法を行なうステップと、

(b) 検出可能なシグナルによってDAMを認識することができる1つまたは複数のS c F v抗体を同定するステップと、

(c) 1つまたは複数の同定したS c F v抗体を含む医薬組成物を調製するステップとを含む方法。

【請求項22】 (a) 請求項18または請求項19に記載の方法を行なうステップと、

(b) DAMを認識することができる1つまたは複数のS c F v抗体を同定するステップと、

(c) DAMを認識することができる1つまたは複数の同定S c F v抗体を修飾するステップと、

(d) 1つまたは複数の修飾したS c F v抗体を含む医薬組成物を調製するス

テップと
を含む方法。

【請求項 2 3】 前記 S c F v 抗体が T A A を認識することができる請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項で定義されているか、請求項 1 7 に記載されているか、請求項 1 8 または請求項 1 9 のインビトロ法によって同定された S c F v 抗体。

【請求項 2 4】 前記 S c F v 抗体が 5 T 4 抗原を認識することができる請求項 2 3 に記載の S c F v 抗体。

【請求項 2 5】 前記 S c F v 抗体がインビトロ法で D A M 抗原を認識し、前記インビトロ法が請求項 1 8 または請求項 1 9 で定義された方法である S c F v 抗体を使用した、インビボにおいて疾患に影響を与える方法。

【請求項 2 6】 医薬組成物を調製するための、請求項 1 ～ 5 で定義されているか、請求項 1 7、請求項 2 3、または請求項 2 4 で定義された S c F v 抗体の使用。

【請求項 2 7】 S c F v 抗体および治療的に有用な他の薬剤を含む、請求項 2 6 に定義された医薬組成物。

【請求項 2 8】 前記治療的に有用な他の薬剤がプロドラッグ活性化酵素である請求項 2 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】 前記治療的に有用な他の薬剤が毒素である請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】 前記 S c F v 抗体が 5 T 4 抗原を認識することができる、請求項 2 6、請求項 2 7、請求項 2 8、または請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】 D A M に関連した病態を治療するための請求項 2 6 ～ 3 0 に記載の医薬組成物の調製における S c F v 抗体の使用。

【請求項 3 2】 D A M に関連した病態を治療するための請求項 2 7 ～ 3 0 で定義された他の治療的に有用な薬剤またはそれをコードする目的のヌクレオチド配列（N O I）と組み合わせた、請求項 1 に記載の D A M を認識することができる S c F v 抗体の使用。

【請求項 3 3】 D A M に関連した疾患のインビボ画像処理および／またはアジュバント治療のための請求項 3 1 または請求項 3 2 に記載の S c F v 抗体の

使用。

【請求項34】 前記疾患が癌である請求項31～33に記載の使用。

【請求項35】 前記ScFv抗体が請求項1～5で定義されているか、請求項17または請求項23～24に記載されているScFv抗体であるか、請求項6～請求項12に記載のヌクレオチド配列、その変異型、ホモログ、断片、または誘導体によって発現されることを特徴とする、ScFv抗体のDAM結合特異性を調整することができる薬剤をスクリーニングするためのScFv抗体の使用。

【請求項36】 (i) 請求項6～請求項12に定義されたScFv抗体またはその発現産物をコードするヌクレオチド配列を得るステップと、

(ii) 個体由来のサンプル中においてDAMに対するScFv抗体の結合を分析するステップと

を含み、前記結合が個体中のDAMの存在の指標であることを特徴とする個体中のDAMの発現および/または活性に関する病態の診断方法。

【請求項37】 DAM関連病態から哺乳動物を保護する治療反応を誘導するために、請求項1～5で定義されているか、請求項17または請求項23～24に記載されているScFv、または請求項6～12に記載のヌクレオチド配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を発現するベクターと、哺乳動物とをインキュベートするステップを含む、インビボでのDAM関連病態を有する哺乳動物における治療反応の誘導方法。

【請求項38】 前記疾患が癌である請求項37に記載の方法。

【請求項39】 実質的に本明細書中に記載され、添付の図面を参照するScFv抗体の使用。

【請求項40】 医薬品として使用するためのScFv抗体。

【請求項41】 配列番号14に示すアミノ酸配列またはその変異型、ホモログ、断片、または誘導体を有するイヌ5T4ポリペプチド。

【請求項42】 請求項41に記載のイヌ5T4ポリペプチドをコードすることができるヌクレオチド配列。

【請求項43】 配列番号15に示す配列またはその変異型、ホモログ、断

片、または誘導体を有する請求項 4 2 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 4 4】 請求項 4 1 に記載のイヌ 5 T 4 ポリペプチドに特異的に結合することができる抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、抗体に関する。

【0002】

特に、本発明は、疾患関連分子 (disease associated molecule; DAM) を認識する抗体に関する。

【0003】

より詳細には、本発明は、DAM関連疾患の診断および治療におけるこれらの抗体のインビトロ (in vitro) およびインビボ (in vivo) / エクスビボ (ex vivo) での適用に関する。

【0004】

(発明の背景)

一定の病態では、細胞代謝の乱れは1つまたは複数のDAMの発現レベルに影響を与え得る。ある環境では、この細胞の乱れによりDAMの発現レベルを変化させることができる。したがって、各疾患誘導因子または病態は、宿主生物の免疫認識および/または疾患誘導因子または病態の消失および/または制御に重要であるかもしれないDAMに関連し得る。このようにして、適切な治療を設計することができるような病態の診断用だけでなく、疾患プロフィールの正確な設定用のマーカーとして作用することができる。

【0005】

十分に特徴づけられているDAMの特定の例には、腫瘍関連抗原 (TAA) が含まれる。ヒトおよび動物の腫瘍において多数の癌胎児性または腫瘍関連抗原 (TAA) が同定および特徴づけられている。

【0006】

これらのTAAには、癌胎児性抗原 (CEA)、TAG72、c-e r B2、(低グリコシル化) MUC-1 および p 53、上皮糖タンパク質-2 抗原 (EGP-2、EGP40、Ep-CAM、KSA、CO17-1A、またはGA733-2としても公知)、および5T4抗原が含まれる。一般に、TAAは、胎児

発生中に発現されるが、成体細胞ではダウンレギュレートされるため、成体では通常存在しないか非常に低レベルで存在する抗原である。しかし、腫瘍形成において、腫瘍細胞は、TAAの発現を再開することが認められている。したがって、悪性細胞をTAA発現の回復によってその非悪性対照物と区別することができると考えられている。したがって、(i) 腫瘍疾患のインビトロおよび/またはインビボ/エキスピボ診断；(ii) 癌の画像処理および/または免疫治療へのTAAの適用 (iii) および腫瘍関連疾患進行の指標が示唆されている。

【0007】

特定の疾患に対するヒトおよび/または細胞免疫応答を高めるために、宿主免疫系をDAMに接触させなければならない。外来抗原の認識に加えて、完全に活性化させるために、T細胞をさらに刺激する必要がある場合がある。現在、抗原を有する標的細胞による天然のT細胞の活性化には、2つのシグナルが必要であることが明らかである。第1のシグナルは、T細胞レセプターから輸送された抗原特異的シグナルであり、第2のシグナルは、リンホカイン生成物を生成する抗原独立または同時刺激シグナルである。これらのさらなるシグナルは、プロ抗原提示細胞 (APC) (樹状細胞およびマクロファージなど) に存在するが他の細胞には存在しないリガンド (B7およびCD40など) と相互作用するT細胞上の他のレセプター (CD28およびCD40L) を介して送達される。これらの同時刺激リガンドを、しばしば同時刺激分子という。

【0008】

例として、最近発見されたB7ファミリー (すなわち、B7. 1、B7. 2、およびおそらくB7. 3) が挙げられるが、これは重要な同時刺激分子群である。B7. 1およびB7. 2は共にIg遺伝子スーパーファミリーのメンバーである。Tリンパ球が抗原のみと遭遇した場合、B7によって同時刺激せずに無反応であるかアポトーシス (プログラム細胞死) を起こす。同時刺激シグナルが得られた場合、標的抗原に対するクローン増殖に反応する。所与の抗原に対して免疫応答が有意に増幅しないのは、同時刺激せずに免疫応答が起こっていると考えられる (Juneら (Immunology Today、15、321~331、1994) ; Chenら (Immunology Today、14、483

～486) ; Townsendら (Science、259、368～370)。
Freemanら (J. Immunol.、143、2714～2722、1989)。
Azumaら (Nature、366、76～79、1993)。
したがって、免疫原性が不十分な疾患細胞の免疫認識の1つの刺激法がDAMの存在下での抗原提示およびリンパ球の同時刺激を向上させると推定されている。

【0009】

例として、一般にDAMを発現するという事実にもかかわらず、癌（腫瘍の確立）などの病態の免疫原性は不十分であり得ることが示されている。B7-1およびB7-2をコードする遺伝子の単独またはサイトカインと組み合わせたトランスフェクションにより、動物モデルの実験用腫瘍に対する免疫の発生を向上させると示されている（例えば、Leongら、1997、Int. J. Cancer、71、476～482；Zitvogelら、1996、Eur. J. Immunol.、26、1335～1341；Cayeuxら、1997、J. Immunol.、158、2834～2841）。しかし、これらの結果の実際のヒト癌治療への移行において、克服すべき多数の重大な問題が存在する。この研究における主要な問題は、効率的な多数の腫瘍細胞へのB7遺伝子のインビボ送達が必要なことである。第2の問題は、他の細胞型に対して指向させる不適切な免疫細胞活性化を回避するための腫瘍細胞へのB7の選択的標的発現である。WO98/55607では、これらの問題のいくつかの解決に取り組んでおり、腫瘍結合タンパク質（TBP）などの腫瘍相互作用タンパク質（TIP）を使用して腫瘍細胞に同時刺激細胞を選択的に標的している。

【0010】

DAMを認識する抗体を開発するために組換えDNA技術が適用されている（Hoogenboomら、1998、Immunotechnology、4、1～20およびWinter、1998、FEBS Lett.、458、92～94）。最近、抗体（一本鎖抗体（ScFv Ab））を作製するための抗体遺伝子ライブラリーの使用が非常に興味をもたれている。一定の環境下では完全な抗体よりもむしろScFv Abの使用が有利であることが周知である。より小さな断片では、クリアランスが急速であり、腫瘍：非腫瘍比が増加し得る。し

かし、特異性の高いScFv Abを生成するための多くの努力は、失敗している。さらに、完全なIgGは血清半減期が長いので、ScFv Abよりも良好な治療Mab形態とみなされている（Vaughanら、1998、Nature Biotech.、16、535～539を参照のこと）。

【0011】

本発明は、DAM関連病態の治療に有用なDAMに対して惹起するScFv Abの獲得を模索する。

【0012】

（発明の要旨）

本発明は、DAMを認識することができ、DAM関連疾患に治療効果を有するScFv Ab（ScFv Ab）を提供する。このScFv Abを、ペプチド（合成または遺伝子発現）または「裸のDNA」（例えば、プラスミド中）として直接投与するか、ScFv Abをコードするヌクレオチド配列を含むウイルスベクターなどの送達媒介物を介して投与することができる。ある場合には、このScFv Abは、分泌同時刺激分子（SCM）（B7またはIgGなど）に融合させたScFv Abよりも有効であり得る。ScFv Abの使用は癌などの疾患の治療用の治療薬として明らかな選択ではなく、特に、ScFvに融合したSCMを含む融合タンパク質がScFvのみよりも良好に作用すると予想される。

【0013】

本発明は以下の理由で有利である。

（i）DAMを認識することができるScFv Abが得られる。いくつかの場合、SCM（B7など）に融合したScFv Abまたは免疫グロブリン（IgGなど）よりも治療効果が高いこと。

（ii）（a）インビトロおよびインビボ／エキスピボ診断および治療、（b）DAMを発現する細胞の画像診断および治療、（c）ScFv Abを単独か適切な診断および／または治療に有用な薬剤との組み合わせで使用される場合の癌などの異なるヒト疾患の予防および／または治療、（d）ScFv Abが特異的に結合するDAMの単離および／または精製に関する研究、および（e）さ

らに合理的な治療 S c F v A b の障壁の構築および標的 D A M に結合することができる S c F v A b のスクリーニングおよび／または標的 S c F v A b に結合することができる D A M のスクリーニングで適用される高親和性 S c F v A b が得られること。

【0014】

(発明の詳細な態様)

本発明の他の態様を添付の特許請求の範囲および以下の説明および図面に示す。これらの態様を個別の節の見出しで示す。しかし、各節の教示は特定の節の見出しに必ずしも制限されないと理解される。

【0015】

S c F v 抗体

1つの態様では、本発明は、D A M を認識する組換え S c F v A b を提供する。

【0016】

本明細書中で使用される、用語「S c F v A b」は、軽鎖可変部 (V L) および重鎖可変部 (V H) を有する D A M 抗原を認識することができる抗体を意味する。V H および V L パートナードメインは、典型的には、可動性オリゴペプチド／ペプチドリンカーを介して連結／結合している。V H および V L パートナードメインを、V H の後ろに V L または V L の後ろに V H の順番で接続することができる。典型的には、V H－リンカー－V L または V L－リンカー－V H の順番でリンカー配列を介して配列を接続することができる。本明細書中で使用されるこの用語には、D A M と選択的に反応するか認識することができる S c F v A b 分子のタンパク質分解性切断断片または組換えにより調製した部分が含まれる。このようなタンパク質分解および／または組換え断片の非限定的な例には、本発明の目的のためにヒト免疫グロブリン遺伝子以外哺乳動物免疫グロブリン遺伝子由来のヌクレオチド配列によってコードされる重鎖および軽鎖可変部 (V H および V L) のいずれかまたは療法またはヒト免疫グロブリン遺伝子由来のヌクレオチド配列によってコードされる重鎖および軽鎖のいずれかまたは療法を有する S c F v A b ということができるキメラ S c F v 抗体が含まれる。S c F v

Abは別の単位（別のScFv Abなど）と共有結合または非共有結合して2つ以上の結合部位を有する抗体を形成することができる。例えば、第1のScFv AbがDAM（5T4など）に結合し、第2のScFv Abが免疫エンハンサー分子に結合することができる。

【0017】

本発明によれば、用語「ScFv Ab」には、ペプチド自体と同様に融合タンパク質の一部としてのペプチド、ペプチドをコードするヌクレオチド配列および／または融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド自体および／または融合タンパク質は、合成ペプチドであり得る。あるいは、ペプチド／融合タンパク質は遺伝子発現／組換えペプチド／融合タンパク質であり得る。いくつかの適用では、用語「ScFv Ab」は、ペプチド自体を意味する。用語「ScFv」には、本明細書中でLScFvと呼ばれる分泌リーダー（L）配列を有するScFv Abも含まれる。

【0018】

本明細書中で使用される、用語「可変部」は、結合認識特異性およびScFv AbのDAMの全親和性についての決定基を含む軽鎖（VL）および重鎖（VH）の可変領域またはドメインをいう。各軽鎖（VL）と重鎖（VH）との対の可変ドメインは、抗原認識に関連し、抗原結合部位を形成する。軽鎖および重鎖ドメインは同一の遺伝子構造を有し、各ドメインは4つのフレームワーク（FR）領域を有し、その構造は比較的保存されており、3つの相補性決定部（CDR）によって接続されている。FR領域は、可変ドメインの構造の完全性を維持している。CDRはDAMなどの抗原の結合を媒介する可変ドメイン内のポリペプチドセグメントである。

【0019】

好ましくは、5T4抗原についての本発明のScFv Abの親和性（ K_D ）は、約 5×10^{-10} ～約 10×10^{-10} である。

【0020】

好ましくは、5T4抗原についての本発明のScFv Abの親和性（ K_D ）は、約 6×10^{-10} ～約 9×10^{-10} である。

【0021】

好ましくは、5T4抗原についての本発明のScFv Abの親和性(K_D)は、約 7×10^{-10} ～約 8×10^{-10} である。

【0022】

好ましくは、5T4抗原についての本発明のScFv Abの親和性(K_D)は、約 7.9×10^{-10} である。ScFv Abの K_D を、BIA評価ソフトウェア(Pharmacia)を使用して測定する。

【0023】

本明細書中で使用される、用語「オフレート」は、抗原からのScFv Abの解離速度(k_{off})を意味する。本発明の文脈では、これをBIA評価ソフトウェア(Pharmacia)を使用して測定する。DAMなどの抗原についてのFab断片の親和性に影響を与えるような低オフレートが望ましい。

【0024】

本明細書中で使用される、用語「親和性」を、DAM抗原からのScFv Abの解離速度またはオフレート(k_{off})の観点から定義する。ScFv Abが有するオフレートが低いほどDAMなどの抗原に対する親和性が高くなる。

【0025】

DAM

本明細書中で使用される、用語「DAM」は、免疫調整剤、サイトカイン、成長因子、細胞表面レセプター、ホルモン、循環分子、炎症性サイトカイン、および病原体(ウイルス、細菌、寄生虫、または酵母など)を含むがこれらに限定されない生物反応修飾物質を含み得るが、これらに限定されない。これらの生物反応修飾物質には、ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エクソダス-2、FGF酸性、FGF塩基性線維芽細胞成長因子10(Marshall、1998、Nature Biotechnology、16、129)、FLT3リガンド(Kimuraら、1997)、フラクタルキン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、インスリン、IFN- γ 、IGF-1、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4

、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72 a. a.)、IL-8 (77 a. a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 (IGIF)、インヒビン α 、インヒビン β 、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2 (KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンホタクチン、ミューラー阻害物質、単球コロニー阻害因子、単球結合タンパク質 (Marshall, 1998、前出)、M-CSF、MDC (67 a. a.)、MDC (69 a. a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC (67 a. a.)、MDC (69 a. a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、骨髄前駆体阻害因子-1 (MPIF-1)、NAP-2、ニューロツリン、神経成長因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、肝細胞刺激因子 (SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、腫瘍壊死因子 (TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNIL-1、TPO、VEGF、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、およびGRO- γ が含まれるが、これらに限定されない。

【0026】

病原体の例には、ウイルス、細菌および寄生虫ならびに酵母を含み得るが、これらに限定されない。例として、病原性ウイルスには、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、インフルエンザ、単純ヘルペスウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、ウマ脳炎ウイルス、肝炎、ネコ白血病、イヌジステンパーおよび狂犬病ウイルス、インフルエンザ、ボックスウイルス、トリボックスウイルス (FPV)、カナリアボックスウイルス、昆虫ボックスウイルス、DNA複製酵素を各ワクシニアウイルス、 α ウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE) が含まれるが、これらに限定されない。病原性細菌の例には、クラミジア、マイコバクテリア、熱帯熱マラリア原虫、レジオネラ、シュードモナス-アエルギノーザ、サルモネラチフィウム、化膿連鎖球菌、淋菌、ジフテリア菌、破傷風菌、ビブリオコレラ、リステリア菌、ウェルシュ菌、大腸菌、

ペスト菌、肺炎球菌およびサルモネラチフィウムを含み得るが、これらに限定されない。病原性寄生虫の例には、トリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、リーシュマニア、ドノバンリーシュマニア、熱帯リーシュマニア、メキシコリーシュマニア、ブラジルリーシュマニア、ジアルジア属、ランブルベン毛虫、トリコモナス、アメーバ、ネグレリア属、アカンソアメーバ属、アカントアメーバ、カステラニ、アカントアメーバクレベルトゾーニおよび他の種プラスモディウム、トキソプラズマ、トキソプラズマ属、クリプトスポリジウム、クリプトスポリジウム *p a r v u*、イソスポラ属、イソスポラベリ、ネグレリア属、ネグレリア *アフォーリ*、バランチジウム属、大腸バランチジウム、バベシア属、住血吸虫、トキシプラズマおよびイヌ回虫が含まれるが、これらに限定されない。病原性酵母の例には、アスペルギルスおよび浸潤性カンジダが含まれる。好ましい実施形態では、病原性細菌は、細胞内生物である。

【0027】

好ましくは、DAMは細胞内病原体である。

【0028】

好ましくは、DAMは疾患関連細胞表面分子 (disease associated cell surface molecule; DACSM) である。

【0029】

本発明によれば、DACSMには、成長因子レセプターなどの接着タンパク質のレセプターを含み得るが、これらに限定されない。成長因子レセプターの例には、ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エクソダス-2、FGF酸性、FGF塩基性線維芽細胞成長因子10 (Marshall, 1998, Nature Biotechnology, 16, 129)、FLT3リガンド (Kimuraら, 1997)、フラクタルキン (CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、インスリン、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72 a. a.)、IL-8 (77 a. a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、I

L-16、IL-17、IL-18 (IGIF)、インヒビン α 、インヒビン β 、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2 (KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンホタクチン、ミューラー阻害物質、単球コロニー阻害因子、単球結合タンパク質 (Marshall, 1998、前出)、M-CSF、MDC (67 a. a.)、MDC (69 a. a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC (67 a. a.)、MDC (69 a. a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、骨髄前駆体阻害因子-1 (MPIF-1)、NAP-2、ニューロツリン、神経成長因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、肝細胞刺激因子 (SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、腫瘍壊死因子 (TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNIL-1、TPO、VEGF、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、1-309が含まれるが、これらに限定されない。成長因子レセプターの不完全なリストの392～297頁の「分子生物学および生物工学」(R. A. Meyers編、1995、VCH Publishers Inc.)に以下を見出すことができる：プラスミノゲンアクチベーター、メタロプロテイナーゼ (コラゲナーゼなど)、ムチン、糖タンパク質、組織分散が制限された抗原、および／または腫瘍細胞増殖、移動、または転移の役割を果たす細胞表面分子 (5T4抗原、腫瘍特異的炭水化物部分、または癌胎児性抗原など)。用語DACSMには、抗原決定基も含み得る。

【0030】

抗原決定基

本明細書中で使用される、用語「抗原決定基」は、疾患または障害に関連する任意の抗原をいう。例として、抗原決定基はまた、生物中で無制限に増加するので病的に増殖し得る疾患細胞 (腫瘍細胞など) に関連する病原体に由来し得る。このような病原体の例は、Davis, B. D. ら (Microbiology、第3版、Harper International Edition) に記

載されている。抗原決定基は、抗原および／または抗原上の免疫優性エピトープであり得る。例として、抗原決定基には、宿主免疫系の標的として作用し、応答を惹起して腫瘍を崩壊させる腫瘍関連抗原（TAA）を含み得る。

【0031】

TAA

本明細書中で使用される、用語「腫瘍関連抗原（TAA）」は、任意のTAAまたはその抗原ペプチドをいう。抗原は、腫瘍自体または腫瘍関連細胞（柔細胞など）または関連する脈管構造細胞によって発現されるものである。用語「腫瘍関連抗原（TAA）」には、腫瘍細胞とその正常な細胞対照物とを区別する抗原が含まれるが、これらは微量で存在する。

【0032】

TAAの例には、MART-1（T細胞-1によって認識される黒色腫抗原）、MAGE-1、MAGE-3、5T4、gp100、癌胎児性抗原（CEA）、前立腺特異的抗原（PSA）、MUCIN（MUC-1）、チロシナーゼが含まれるが、これらに限定されない。特に好ましいTAAは、細胞表面分子であり、これは、免疫系のエレメントによる認識のために存在し、治療（治療および／または免疫治療など）の優れた標的であるからである。本発明は、上記のTAAをコードする抗原決定基に決して制限されない。米国特許第4,514,506号などに記載の当該分野で公知の方法によって他のTAAを同定、単離、およびクローン化することができる。

【0033】

5T4 TAA

TAA 5T4（WO89/07947を参照のこと）は、広く一般に特徴づけられている。これは、癌で広く一般に発現されるが、正常な成体組織ではその発現パターンが非常に制限される72kDaの糖タンパク質である。これは、直腸結腸癌および胃癌における転移に強く相関するようである。ヒト5T4の完全な核酸配列は公知である（Myersら、1994、J. Biol. Chem.、169、9319～24）。

【0034】

同時刺激分子

DAMに応答させるために、リンパ球はエフェクター機能を活性化させるために少なくとも2つの異なるシグナルを必要である (BretscherおよびCohn, 1970, Science, 169, 1042から1049; Crabtree, 1989, Science, 243, 355~361)。主要シグナルは抗原に特異的である。単離における主要シグナルの刺激により、通常、リンパ球のアポトーシス (プログラム細胞死) が誘導され、持続性無応答または無反応状態が確立される (Weissら、前出)。リンパ球を活性化させるために、サイトカインまたは抗原提示細胞 (APC) 上に存在する細胞表面同時刺激リガンドによって送達することができる補助シグナルが必要である。

【0035】

現在同定されているこのような同時刺激分子が多数存在し、接着分子、LFA-3、ICAM-1、ICAM-2が含まれる。APC上に存在する主要な同時刺激分子は、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、およびB7-3を含むB7ファミリーのメンバーである。これらの分子は、CD28 (WO92/00092) (おそらく休止T細胞の最も重要な同時刺激レセプター) を含むリンパ球に対する同時刺激レセプターのリガンドである。糖タンパク質のB7ファミリーの異なるメンバーは、微妙に異なるシグナルをT細胞に送達させることができる (Nunesら、1996, J. Biol. Chem., 271, 1591~1598)。

【0036】

本発明の1つの実施形態では、DAM (腫瘍抗原) に対して結合親和性を有する分泌同時刺激分子 (「SCM」) を含むScFv Abを使用する。

【0037】

ScFv Ab供給源

本発明のScFv Abを天然または非天然の任意の適切な供給源から獲得または生成するか、本発明のScFv Abの必要なDAM結合特異性を保持している場合、合成ScFv Ab、半合成ScFv Ab、模倣物、誘導ScFv Ab、組換えScFv Ab、発酵至適化ScFv Ab、融合タンパク質ま

たは等価物、変異体および誘導体であり得る。これらには、アミノ酸置換を有するかアミノ酸官能基に結合した糖または他の分子を有し得るDAM結合特異性を有するScFv Abが含まれる。

【0038】

用語「模倣物」は、ペプチド、ポリペプチド、抗体または本発明のScFv Abと同一の結合親和性を有する他の有機化学物質であり得る任意の化学物質をいう。

【0039】

本明細書中で使用される、用語「誘導体」または「誘導化」には、ScFv Abの化学修飾が含まれる。このような修飾の例は、水素のアルキル、アシル、またはアミノ基への置換である。好ましくは、ScFv Abには、組換えDNA技術または化学合成またはその組み合わせによって生成された少なくとも一部が含まれる。

【0040】

好ましくは、ScFv Abは、化学合成技術を使用して調製する。

【0041】

化学合成法

本発明のScFv Abまたはその変異型、ホモログ、誘導体、断片、もしくは模倣物を、ScFv Abアミノ酸配列（全体または一部）の化学合成法を使用して生成することができる。例えば、固相技術によってペプチドを合成し、樹脂から切断し、分離用高速液体クロマトグラフィーによって精製ことができる（例えば、Creighton、1983、「タンパク質構造および分子の原理」、WH Freeman and Co.、New York、NY）。合成ペプチドの組成を、アミノ酸分析または配列決定によって確認することができる（例えば、エドマン分解法、Creighton、前出）。

【0042】

種々の固相技術（Roberge JYら、1995、Science、269、202～204）を使用してScFv Abまたはその変異型、ホモログ、誘導体、断片、もしくは模倣物の直接的合成を行うことができ、例えば製造者の

指示にしたがってABI 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を使用して自動化合成を行うことができる。さらに、ScFv Abから得ることができるアミノ酸配列またはその任意の部分或直接合成中に変化させ、そして／または他のサブユニットまたはその任意の一部由来の配列を使用した化学的方法を使用して組み合わせて変異型ScFv Abを生成することができる。

【0043】

本発明の別の実施形態では、ScFv Abのコード配列またはその変異型、ホモログ、誘導体、断片、もしくは模倣物の全部または一部を、当該分野で周知の化学的方法を使用して合成することができる(Caruthers MHら、1980、Nuc. Acids Res. Symp. Ser.、215～23、Horn Tら、1980、Nuc. Acids Res. Symp. Ser.、225～232を参照のこと)。

【0044】

好ましくは、本発明のScFv Abは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む(図1を参照のこと)。

【0045】

好ましくは、本発明のScFv Abは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含む(図2を参照のこと)。

【0046】

好ましくは、本発明のScFv Abは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む(図6を参照のこと)。

【0047】

アミノ酸配列

本明細書中で使用される、用語「アミノ酸配列」は、ペプチド、ポリペプチド配列、タンパク質配列、またはその一部をいう。

【0048】

好ましくは、ScFv Abは、単離ScFv Abおよび／または精製および／または非天然ScFv Abである。

【0049】

本発明の S c F v A b は、実質的に単離された形態であり得る。タンパク質は目的の S c F v A b に干渉せず、キャリアまたは希釈剤と組み合わせることができるが実質的に単離しているとみなされると理解される。一般に調製物中に 90% を超える（例えば、S c F v A b の 95%、98%、または 99%）S c F v A b（配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 4 を含むペプチドまたはその変異型、ホモログ、誘導体、または断片を含む）を含む場合、本発明の S c F v A b はまた実質的に精製された形態である。

【0050】

アミノ酸配列の変異型／ホモログ／誘導体

本発明の好ましいアミノ酸配列を、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 4 に記載し、これは、本発明の S c F v A b から得ることができる配列だけでなく、任意の供給源（例えば、関連ウイルス／細菌タンパク質）から得られた相同配列、細胞ホモログおよび合成ペプチドならびにその誘導体も含まれる。

【0051】

本発明はまた、初めてイヌ 5 T 4 全アミノ酸配列および核酸配列を提供する（図 26 および配列番号 14 および 15）。したがって、本発明はまた、i）配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有するイヌ 5 T 4 ポリペプチドまたはその変異型、ホモログ、断片もしくは誘導体および

i i）このようなイヌ 5 T 4 ポリペプチドをコードすることができるヌクレオチド配列を提供する。好ましくは、ヌクレオチド配列は、配列番号 15 に記載の配列またはその変異型、ホモログ、断片、もしくは誘導体を有する。

【0052】

したがって、本発明は、本明細書中に示したアミノ酸配列の変異型、ホモログもしくは誘導体またはこれらのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の変異型、ホモログもしくは誘導体を対象とする。

【0053】

本発明の文脈では、相同配列には、少なくとも例えば本明細書中の配列表の配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を越えるアミノ酸レベルで、少なくとも 75%、85%、または 90% 同一、好ましくは 95%

または98%同一のアミノ酸が含まれる。特に、相同性は、典型的には、非必須連続配列よりもむしろ結合特異性に必須であることが公知の配列領域（その位置でのアミノ酸）と考えるべきである。本発明の文脈では、相同性はまた類似性（すなわち、類似の化学的性質／機能を有するアミノ酸残基）とみなすことができるが、配列同一性をという点では相同性と表現することが好ましい。

【0054】

目視、またはより一般的には容易に利用可能な配列比較プログラムの支援によって相同性の比較を行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列の相同性%を計算することができる。

【0055】

連続配列から相同性%を計算することができる（すなわち、一方の配列を他方の配列と整列させ、一方の配列中の各アミノ酸を他の配列中の対応するアミノ酸と一度に1残基ずつ直接比較する）。これを「無ギャップ」アラインメントという。典型的には、比較的少数の残基のみに対してこのような無ギャップアラインメントを行う。

【0056】

これは非常に簡単で一貫した方法であるにもかかわらず、例えば、他の同一の配列対において、1つの挿入または欠失によりその後のアミノ酸残基がアラインメントから外れるので、全体的なアラインメントを行った場合に相同性%が非常に減少することを考慮していない。したがって、ほとんどの配列比較法は、全体的な相同性スコアに過剰なペナルティを課すことなく可能な挿入および欠失を考慮した最適なアラインメントを作製するように設計されている。局所相同性が最大になるように配列アラインメント中に「ギャップ」を挿入することによりこれを行う。

【0057】

しかし、これらのより複雑な方法は、同数の同一アミノ酸において、できるだけ少ないギャップを有する配列アラインメント（2つの比較配列間の関連性に大きく影響する）により多数のギャップを有するアラインメントよりも高いスコアが得られるようなアラインメントが得られるように各ギャップに「ギャップペナ

ルティー」を指定する。典型的には、ギャップの存在には比較的高いスコアを課し、ギャップ中のそれぞれの次の残基にはより小さなペナルティーを課す「アフィンギャップコスト」を使用する。これは最も一般的に使用されているギャップスコアリングシステムである。勿論、高ギャップペナルティーにより、より少ないギャップを有する至適化アラインメントが得られる。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティーを修正することができる。しかし、このような配列比較用ソフトウェアを使用する場合はデフォルト値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（以下を参照のこと）を使用する場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティーは、ギャップでは-12であり、各伸長では-4である。

【0058】

したがって、最大相同性%の計算には、最初にギャップペナルティーを考慮した至適アラインメントの作製が必要である。このようなアラインメントを実行するための適切なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（ウィスコンシン大学、U. S. A.、Devereuxら、1984、Nucleic Acids Research、12、387）である。配列比較ができる他のソフトウェアの例には、比較ツールのBLASTパッケージ（Ausubelら、1999、前出、第18章を参照のこと）、FASTA（Atschulら、1990、J. Mol. Biol.、403～410）、およびGENEWORKSパッケージソフトが含まれるが、これらに限定されない。BLASTおよびFASTAは共にオフラインおよびオンライン検索で利用可能である（Ausubelら、1999、前出、7～58から7～60を参照のこと）。しかし、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。BLAST2配列と呼ばれる新規のツールはまた、タンパク質およびヌクレオチド配列の比較に利用可能である（FEMS Microbiol Lett.、1999、174（2）、247～50、FEMS Microbiol. Lett.、1999、177（1）、187～8およびtatiana@ncbi.nlm.nih.govを参照のこと）。

【0059】

最終相同性%を同一性に関して測定することができるにもかかわらず、アラインメント過程自体は全か無かの対比較に基づいていない。そのかわり、一般に化学的類似性または進化距離に基づいた各対の比較にスコアを割り当てる評価類似性スコア行列を使用する。共通に使用したこのような行列の例はBLOSUM62行列（BLASTプログラムパッケージ用のデフォルト行列）である。GCG Wisconsinプログラムは、一般に、公的なデフォルト値または供給されている場合はカスタムシンボル比較のいずれかを使用する（さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照のこと）。GCGパッケージには公的なデフォルト値を使用し、他のソフトウェアの場合にはBLOSUM62などのデフォルト行列を使用することが好ましい。

【0060】

一旦ソフトウェアで最適なアラインメントを作製すると、相同性%、好ましくは配列同一性%を計算することが可能である。典型的には、このソフトウェアでは配列比較の一部を行い、多数の結果が得られる。

【0061】

本発明のアミノ酸配列に関する用語「変異型」または「誘導体」には、配列由来の1つ（または複数の）アミノ酸の任意の置換、変形、改変、置換、欠失、または付加が含まれ、得られたアミノ酸配列は、結合特異性、好ましくは本明細書中の配列表の配列番号1、配列番号3、または配列番号4に記載のアミノ酸配列と同一の配列特異性を有する結合特異性を有する。

【0062】

本明細書中の配列表の配列番号1もしくは配列番号3または配列番号4もしくは配列番号14を、本発明用に改変することができる。典型的には、配列の結合特異性を維持するように改変を行う。例えば、改変配列が必要な結合特異性を保持する場合は、1、2、または3～10または20個のアミノ酸置換を行うことができる。アミノ酸置換には、天然に存在しないアナログの使用を含むことができる。

【0063】

本発明のScFv Abはまた、わずかな変化により機能的に等価なScFv

A b が得られるアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を含み得る。S c F v A b の結合特異性が保持されている限り、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および／または両親媒性に基づいて慎重にアミノ酸置換を行うことができる。例えば、負電荷のアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正電荷のアミノ酸にはリジンおよびアルギニンが含まれ、類似の疎水値を有する無電荷の極性末端基を有するアミノ酸にはロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。同様に、イヌ 5 T 4 配列にも適用する。

【0064】

例えば以下の表に従って、保存的置換を行うことができる。第2列中の同ブロック中のアミノ酸および好ましくは第3列中の同一のライン中のアミノ酸をそれぞれ置換することができる。

【0065】

【表1】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性－無電荷	CSTM
		NQ
	極性－電荷	DE
		KR
芳香族		HFWY

【0066】

好ましくは、単離S c F v A b および／または精製S c F v A b および／または非天然S c F v A b および／または5 T 4 配列を、組換え技術を使用して調製する。

【0067】

イヌ 5 T 4 配列の断片に関して、断片は、配列番号14に記載のアミノ酸1～182および／または297～420の少なくとも1つ、好ましくは数個、最も好ましくは全てを含むことが好ましい。

【0068】

ヌクレオチド配列

遺伝コードの縮重の結果として、多数の異なるヌクレオチド配列は本発明の同一のScFv Abをコードすることができることが当業者に理解される。さらに、当業者は、日常的な技術を使用して、本発明のScFv Abが発現される任意の特定の宿主生物のコードンの使用法を反映するために本発明のヌクレオチド配列によってコードされるScFv Abに影響を与えないヌクレオチド置換を行うことができることが理解される。

【0069】

本発明の配列番号5（図1を参照のこと）、配列番号7（図2を参照のこと）、または配列番号8（図6を参照のこと）に記載のヌクレオチド配列に関する用語「変異型」、「ホモログ」、または「誘導体」には、配列由来の1つ（または複数の）核酸の任意の置換、変形、改変、置換、または欠失が含まれ、得られたヌクレオチド配列は、結合特異性、好ましくは本明細書中の配列表の配列番号5、配列番号7、または配列番号8に記載のヌクレオチド配列と同一の結合特異性を有するScFv Abをコードする。

【0070】

本発明の配列番号15に記載のヌクレオチド配列に関する用語「変異型」または「誘導体」には、配列由来の1つ（または複数の）核酸の任意の置換、変形、改変、置換、欠失、または付加が含まれ、得られたヌクレオチド配列は、イヌ5 T4ポリペプチド、好ましくは本明細書中の配列表の配列番号14に記載のポリペプチド配列をコードする。

【0071】

上記のように、配列相同性に関して、本明細書中に記載の配列表に示す配列に対して好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%相同である。より好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%相同である。ヌクレオチド相同性の比較を上記のように行うことができる。好ましい配列比較プログラムは、上記のGCG Wisconsin Bestfitプログラムである。デフォルトスコアリング行

列は、各同一のヌクレオチドについては10、各ミスマッチについては-9の適合値を有する。デフォルトギャップ作製ペナルティーは-50であり、各ヌクレオチドについてのデフォルトギャップ伸長ペナルティーは-3である。

【0072】

本発明はまた、本明細書中に記載の配列またはその変異型、断片もしくは誘導体または上記の任意の相補物と選択的にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を含む。ヌクレオチド配列は、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも20、30、40、または50ヌクレオチド長である。

【0073】

イヌ5T4配列の断片に関して、断片は、配列番号15に記載の核酸1〜546および／または890〜1263の好ましくは少なくとも1つ、好ましくは数個、最も好ましくは全てを含む。

【0074】

ハイブリッド形成

本明細書中で使用される、用語「ハイブリッド形成」には、「核酸鎖が塩基対合によって相補鎖と連結する工程」およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術で行われる増幅工程が含まれる。

【0075】

本明細書中に記載のヌクレオチド配列またはその相補物と選択的にハイブリッド形成することができる本発明のヌクレオチド配列は、本明細書中に記載の対応するヌクレオチド配列に対して、少なくとも20、好ましくは少なくとも25または30、例えば少なくとも40、60、または100またはそれ以上の連続ヌクレオチド領域中で一般に少なくとも75%、好ましくは85%または90%、より好ましくは少なくとも95%または98%相同である。本発明の好ましいヌクレオチド配列は、本発明の配列表の配列番号5、配列番号7、配列番号8またはまたは配列番号15に記載のヌクレオチド配列に対して好ましくは少なくとも80%または90%、より好ましくは95%相同な本発明の配列表の配列番号5、配列番号7、または配列番号8に記載のヌクレオチド配列に対して相同な領域

を含む。

【0076】

用語「選択的にハイブリッド形成可能な」は、プローブとして使用されるヌクレオチド配列を本発明の標的ヌクレオチド配列をバックグラウンドよりも有意に高いレベルでプローブとハイブリッド形成することが見出された条件下で使用することを意味する。例えば、スクリーニングされるcDNAまたはゲノムDNAライブラリー中に存在する他のヌクレオチド配列のために、バックグラウンドハイブリッド形成が起こり得る。この事象では、バックグラウンドは、プローブと非特異的DNAライブラリー数との間の相互作用によって発生するシグナルのレベルを意味し、標的DNAを使用して認められた特異的相互作用の $1/10$ 未満、好ましくは $1/100$ 未満の強度である。相互作用の強度を、例えば放射性標識プローブ（例えば、 ^{32}P ）によって測定することができる。

【0077】

ハイブリッド形成条件は、BergerおよびKimmel（1987、「分子クローニング技術ガイド」、Methods in Enzymology、第152巻、Academic Press、San Diego、CA）に記載の教示および以下に説明の「ストリンジェンシー」の定義のように、核酸結合複合体の融点（ T_m ）に基づく。

【0078】

典型的には、最大ストリンジェンシーは約 $T_m - 5^\circ\text{C}$ （プローブの T_m より 5°C 低い）であり、高ストリンジェンシーは T_m より約 $5^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 低く、中間のストリンジェンシーは、 T_m より約 $10^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ 低く、低ストリンジェンシーは T_m より $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 低い。当業者に理解されるように、最大のストリンジェンシーでのハイブリッド形成を使用して、同一のヌクレオチド配列を同定または検出し、中間（または低）のストリンジェンシーでのハイブリッド形成を使用して類似または関連するポリヌクレオチド配列を同定または検出することができる。

【0079】

好ましい態様では、本発明は、ストリンジェントな条件下（例えば、 65°C お

よび0.1×SSC(1×SSC=0.15MのNaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0))で本発明のヌクレオチド配列とハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を対象とする。本発明のヌクレオチド配列が二本鎖である場合、個別または組み合わせのいずれかの二重らせんは本発明に含まれる。ヌクレオチド配列が一本鎖である場合、ヌクレオチド配列の相補配列もまた本発明の範囲内に含まれると理解される。

【0080】

本発明の配列に100%相同ではないが本発明の範囲内であるヌクレオチド配列を、多数の方法で得ることができる。本明細書中に記載の配列の他の変異型を、例えば、一定範囲の供給源から作製したDNAライブラリーの探索によって得ることができる。さらに、他のウイルス/細菌または細胞ホモログ、特に哺乳動物細胞で見出される細胞ホモログ(例えば、ラット、マウス、ウシ、および霊長類細胞)を得ることができ、このホモログおよびその断片は一般に本明細書中の配列表に記載の配列と選択的にハイブリッド形成することができる。他の動物種から作製したcDNAライブラリーまたはゲノムDNAライブラリーの探索および高ストリンジエンシーの培地条件下で本発明の配列表の配列番号5、配列番号7、配列番号8または配列番号15に記載のヌクレオチド配列の全部または一部を含むプローブでのこのようなライブラリーの探索によってこのような配列を得ることができる。類似の検討材料を適用して、本発明のアミノ酸および/またはヌクレオチド配列の種ホモログおよび対立遺伝子変異型を得る。

【0081】

変異型および株/種ホモログを、本発明の配列内の保存アミノ酸配列をコードする変異型およびホモログ内の配列を標的するように設計したプライマーを使用する縮重PCRを使用しても得ることができる。例えば、アミノ酸配列のいくつかの変異型/ホモログとの整列によって保存配列を予想することができる。当該分野で公知のコンピュータソフトウェアを使用して、配列アラインメントを行うことができる。例えば、GCG Wisconsin PileUPプログラムが広く一般に使用されている。縮重PCRで使用されるプライマーは、1つまたは複数の縮重点を含み、既知の配列に対する一本鎖配列プライマーを使用した配

列のクローニングで使したもののよりも低いストリンジェンシー条件で使される。

【0082】

あるいは、特徴づけた配列（本発明の配列表の配列番号5、配列番号7、配列番号8、または配列番号15に記載のヌクレオチド配列など）の部位特異的変異誘発によってこのようなヌクレオチドを得ることができる。これは、例えば、ヌクレオチド配列が発現された特定の宿主細胞のコドン優先度を最適化するために、サイレントコドンの変化が必要である場合に有用であり得る。制限酵素認識部位を導入するためまたはヌクレオチド配列によってコードされるScFv-Abの結合特異性を変化させるために、他の配列の変化が望ましいであろう。

【0083】

本発明のヌクレオチド配列を使用して、プライマー（例えば、PCRプライマー（別の増幅反応用のプライマー））、プローブ（例えば、放射性または非放射性標識を使用して従来の手段によって明らかな標識を使用して標識）を作製する、ヌクレオチド配列をベクターにクローン化することができる。このようなプライマー、プローブ、および他の断片は、少なくとも15、好ましくは少なくとも20、例えば少なくとも25、30、または40ヌクレオチド長であり、これらもまた本明細書中で使される本発明の用語「ヌクレオチド配列」に含まれる。

【0084】

本発明のDNAポリヌクレオチドなどのヌクレオチド配列およびプローブを、組換え、合成、または当業者が利用可能な任意の手段によって作製することができる。これらを、標準的な技術によってクローン化することもできる。

【0085】

一般に、所望の核酸配列を一度に1つのヌクレオチドずつ製造する段階的製造を含む合成手段によってプライマーを作製する。自動化技術を使用してこれを行う技術を、当該分野で容易に利用することができる。

【0086】

一般に、例えば、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）クローニング技術を使用した組換え手段を使用して、より長いヌクレオチド配列を作製する。これには、ク

ローン化することを所望する標的配列領域に隣接する一対のプライマー（例えばヌクレオチド約15～30）を作製する工程と、プライマーを動物またはヒト細胞から得たmRNAまたはcDNAと接触させる工程と、所望の領域が増幅される条件下でポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程と、増幅産品とを単離する工程と（例えば、アガロースゲルによる反応混合物の精製による）、増幅DNAを回収する工程とを包含する。増幅DNAを適切なクローニングベクターにクローン化することができるように適切な制限酵素認識部位を含むようにプライマーを設計することができる。

【0087】

遺伝コードの生来の縮重により、実質的に同一であるか機能的に等価のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を使用して、ScFv Abをクローン化および発現することができる。当業者が理解するように、天然に存在しないコドン保有するヌクレオチド配列がコードするScFv Abを作製することが有利であり得る。例えば、ScFv Ab発現を増加させるか、天然に存在する配列から作製した転写物よりも所望の特性（半減期など）を有する組換えRNA転写物を作製するために特定の原核生物または真核生物宿主に好ましいコドン（Murray Eら、1989、Nuc. Acids Res.、17、477～508）を選択することができる。

【0088】

本発明の1つの実施形態では、ScFv Abは組換えScFv Abである。

【0089】

好ましくは、組換えScFv Abを、遺伝ベクターを使用して調製する。

【0090】

ベクター

当該分野で周知のように、ベクターはある環境から別の環境へ単位の運搬を可能にするか容易にするツールである。本発明および実施例によれば、本発明のヌクレオチド配列を含むベクターの複製および／または本発明のヌクレオチドによってコードされる本発明のタンパク質の発現の目的で、組換えDNA技術で使用

したいいくつかのベクターにより単位（DNAセグメントなど（異種cDNAセグメントなどの異種DNAセグメントなど））が宿主および／または標的細胞に運搬される。組換えDNA技術で使したベクターの例には、プラスミド、染色体、人工染色体、またはウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

【0091】

用語「ベクター」には、発現ベクターおよび／または形質転換ベクターが含まれる。

【0092】

用語「発現ベクター」は、インビボまたはインビトロ／エキスビボ発現が可能な構築物を意味する。

【0093】

用語「形質転換ベクター」は、ある種を別の種に移行させることができる構築物を意味する。

【0094】

「裸のDNA」

ウイルス感染用に本発明のScFv Abをコードするヌクレオチド配列を含み、好ましくは宿主細胞ゲノムに相補的な隣接配列をさらに含むベクターを、「裸の核酸構築物」として直接投与することができる。

【0095】

本明細書中で使用される、用語「裸のDNA」は、産生を制御するための短いプロモーター領域と共に本発明のScFv Abをコードするヌクレオチド領域を含むプラスミドをいう。プラスミドは任意の送達媒介物中に含まれないので、これを「裸」DNAと呼ぶ。このようなDNAプラスミドが宿主細胞（真核細胞など）に侵入した場合、コードされるタンパク質（ScFv Abなど）は細胞内で転写および翻訳される。

【0096】

非ウイルス送達

あるいは、本発明のヌクレオチド配列を含むベクターを、当該分野で公知の種々の非ウイルス技術（トランスフェクション、形質転換、エレクトロポレーション

ン、および微粒子銃形質転換など)を使用して適切な宿主細胞に移入することができる。

【0097】

本明細書中で使用される、用語「トランスフェクション」は、非ウイルスベクターを使用して遺伝子を標的哺乳動物細胞に送達させる工程をいう。

【0098】

典型的なトランスフェクション法には、エレクトロポレーション、DNA微粒子銃、脂質媒介トランスフェクション、簡素化DNA媒介トランスフェクション、リボソーム、免疫リボソーム、リポフェクチン、陽イオン性薬剤媒介、陽イオン性表面両親媒性物質(CFA)(Nature Biotechnology、1996、14、556)、多価陽イオン(スぺルミン、カチオニックリピド、またはポリリジン)、1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)-コレステロール複合体(WolffおよびTrubetskoy、1998、Nature Biotechnology、16、421)、およびその組み合わせが含まれる。

【0099】

哺乳動物細胞による裸の核酸構築物の取り込みを、例えばトランスフェクション剤の使用を含むいくつかの公知のトランスフェクション技術によって向上させる。これらの薬剤の例には、陽イオン剤(例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストラン)およびリポフェクタント(例えば、リポフェクタム(商標)およびトランスフェクタム(商標))が含まれる。典型的には、核酸構築物をトランスフェクション剤と混合して組成物を作製する。

【0100】

ウイルスベクター

あるいは、本発明のヌクレオチド配列を含むベクターを、当該分野で公知の種々のウイルス技術(例えば、組換えウイルスベクター(レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびアデノウイルスなど)での感染など)を使用して適切な宿主細胞に移入することができる。

【0101】

好ましくは、ベクターは組換えウイルスベクターである。適切な組換えウイルスベクターには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、またはパルボウイルスベクター (Kestlerら、1999、Human Gene Ther.、10 (10)、1619～32を参照のこと) が含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターの場合、遺伝子送達には標的細胞のウイルス感染によって媒介される。

【0102】

レトロウイルスベクター

レトロウイルスの例には、マウス白血病ウイルス (MLV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、マウス乳癌ウイルス (MMTV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、フジナミ肉腫ウイルス (FuSV)、モロニーマウス白血病ウイルス (Mo-MLV)、FBRマウス骨肉腫ウイルス (FBR MSV)、モロニーマウス肉腫ウイルス (Mo-MSV)、アベルソンマウス白血病ウイルス (A-MLV)、骨髓球腫ウイルス-29 (MC29)、およびトリ赤芽球症ウイルス (AEV) が含まれるが、これらに限定されない。

【0103】

本発明での使用に好ましいベクターは、組換えウイルスベクター、特に組換えレトロウイルスベクター (RRV) (レンチウイルスベクターなど) である。

【0104】

用語「組換えレトロウイルスベクター」(RRV) は、封入成分の存在下でRNAゲノムを標的細胞に感染することができるウイルス粒子への封入に十分なレトロウイルス遺伝情報を有するベクターをいう。標的細胞の感染には、標的細胞ゲノムの逆転写および組み込みが含まれる。RRVがベクターによって標的細胞に輸送される非ウイルスコード配列を有する。RRVは、最終標的細胞内で伝染性レトロウイルス粒子を産生する独立の複製が不可能である。通常、RRVは、機能的 gag-pol および/または env 遺伝子および/または複製に必須の

他の遺伝子を欠く。本発明のベクターを、スプリットーイントロンベクターとして作製することができる。スプリットーイントロンベクターは、PCT特許出願WO99/15683に記載されている。

【0105】

レトロウイルスの詳細なリストは、Coffinら（「レトロウイルス」、1997、Cold Spring Harbor Laboratory Press、J. M. Coffin、SM Hughes、HE Varmus編、758～763頁）に見出すことができる。

【0106】

レンチウイルスベクター

レンチウイルスを、霊長類および非霊長類群に分類することができる。霊長類レンチウイルスの例には、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒト自己免疫不全症候群（AIDS）の原因因子、およびサル免疫不全ウイルス（SIV）が含まれるが、これらに限定されない。非霊長類レンチウイルス群には、プロトタイプ「遅発性ウイルス」visna/maediウイルス（VMV）ならびに関連ヤギ関節炎-脳炎ウイルス（CAEV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、およびさらに細菌記載されたネコ免疫不全ウイルス（FIV）、およびウシ免疫不全ウイルス（BIV）が含まれる。

【0107】

レンチウイルスファミリーと他のレトロウイルス型の間の相違は、レンチウイルスが分裂および非分裂細胞を共に感染させる能力を有することである（Lewisら、1992、EMBO. J.、11、3053～3058；LewisおよびEmerman、1994、J. Virol.、68、510～516）。これに対して、他のレトロウイルス（MLVなど）は、非分裂細胞（例えば筋肉、脳、肺、および肝臓組織を作製する細胞など）に感染不可能である。

【0108】

アデノウイルス

本発明の1つの態様では、アデノウイルスの特徴をレトロウイルス/レンチウイルスの遺伝子安定性と組み合わせ、これを使用して標的細胞に形質導入し隣接

細胞に安定に感染することができる一過性レトロウイルス産生細胞を作製することができる。本発明のScFv Abを発現するように操作したこのようなレトロウイルス産生細胞を、癌などの疾患の治療において生物（動物またはヒトなど）に移植することができる。

【0109】

ボックスウイルス

本発明で使用される好ましいベクターは、組換えボックスウイルスベクター（トリボックスウイルス（FPV）、エントモボックスウイルス、ワクシニアウイルス（NYVACなど）、カナリアボックスウイルス、MVAなど）または他の非複製ウイルスベクター系（例えば、WO95/30018に記載のものなど）である。

【0110】

ハイブリッドウイルスベクター

さらに広範な態様では、本発明は、本発明のScFv Abをコードするヌクレオチド配列のインビボ送達用のハイブリッドベクター系を提供し、この系は、第2のウイルスベクターをコードする1つまたは複数の第1のウイルスベクターを含み、第1のベクターは、第1の標的細胞に感染してその細胞中で第2のウイルスベクターを発現することができ、第2のベクターは、第2の標的細胞に形質導入することができる。

【0111】

好ましくは、第1のベクターをアデノウイルスベクターから得るかそれに基づき、そして／または第2のウイルスベクターをレトロウイルス（好ましくは、レンチウイルスベクター）から得るかそれに基づく。

【0112】

標的化ベクター

用語「標的化ベクター」は、細胞に感染／トランスフェクション／形質導入するか宿主および／または標的細胞で発現する能力が宿主生物内の一定の細胞型（通常、共通または類似の表現型を有する細胞）に制限されるベクターをいう。

【0113】

複製ベクター

本発明の S c F v A b をコードするヌクレオチド配列を、組み換え複製用ベクターに組み込むことができる。ベクターを使用して、適合性宿主細胞中のヌクレオチド配列を複製することができる。したがって、本発明の 1 つの実施形態では、本発明は、複製用ベクターへの本発明のヌクレチド配列の導入、適合性宿主宿主細胞へのベクターの導入、およびベクターが複製する条件下での宿主細胞の増殖による本発明の S c F v A b n 作製法を提供する。ベクターを宿主細胞から回収することができる。

【0114】

発現ベクター

好ましくは、ベクターに挿入される本発明のヌクレオチド配列は、宿主細胞によってコード配列（本発明の S c F v A b のコード配列など）を発現することができる調節配列に作動可能に連結されている（すなわち、ベクターは発現ベクターである）。宿主組換え細胞によって産生された S c F v A b を、使用した配列および／またはベクターに依存して分泌するか細胞内に含めることができる。当業者に理解されるように、S c F v A b コード配列を含む発現ベクターを、特定の原核または真核細胞膜による S c F v A b コード配列の分泌を指向するシグナル配列を使用して設計することができる。

【0115】

インビトロ発現

本発明のベクターを、以下に記載のように適切な宿主細胞および／または標的細胞に形質転換またはトランスフェクトして、本発明の S c F v A b を発現することができる。このステップには、S c F v A b をコードするコード配列のベクターによって発現する条件下での発現ベクターで形質転換した宿主細胞および／または標的細胞を培養するステップと、任意選択的に発現した S c F v A b を回収するステップを含み得る。ベクターは、例えば、複製起点、任意選択的にポリヌクレオチドの発現プロモーター、および任意選択的にプロモーターのレギュレーターを含むプラスミドまたはウイルスベクターであり得る。ベクターは、1 つまたは複数の選択マーカー遺伝子（例えば、哺乳動物ベクター用の細菌プ

ラスミドまたはネオマイシン耐性遺伝子の場合、アンピシリン耐性遺伝子)を含み得る。本発明のScFv Abの発現は、継続的に産生されるよう構成的であってもよく、発現開始のために刺激を要求する誘導的であってもよい。誘導的な発現の場合、必要ならば、例えば培養培地へのインデューサー物質(例えば、デキサメタゾンまたはIPTG)の添加によってScFv Ab産生を開始することができる。

【0116】

ScFv Ab構築物

融合タンパク質

本発明のScFv Abを、例えば抽出および精製を補助するために融合タンパクとして産生させることができる。融合タンパク質パートナーの例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6xHis、GAL4(DNA結合および/または転写活性化ドメイン)、およびβ-ガラクトシダーゼが含まれる。融合タンパク質パートナーの他の例には、抗原性共タンパク質(比較的大きな共タンパク質であり、溶解してその産生および精製を容易にするGST、β-ガラクトシダーゼまたはインフルエンザ菌由来のリポタンパク質)を含む融合組換えScFv Abタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、融合タンパク質は、キャリアタンパク質(ウシ血清アルブミン(BSA)またはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH))を含み得る。本発明の一定の態様では、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen Inc.)で得られるかGentzら(1989、PNAS、86、821~824)に記載のヘキサヒスチジンペプチドである。このような融合タンパク質は、酵母培地(Mitchellら、1993、Yeast、5、715~723に記載)で容易に発現可能であるか、親和性クロマトグラフィーによって容易に精製される。

【0117】

他の組換え構築物は、ScFv Abコード配列を可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に連結することができる(Kroll DJら、1993、DNA Cell Biol.、12、441~53)。このような精製を容易にするドメインには、金属キレート

化ペプチド（固定金属上で精製するヒスチジーントリプトファンモジュール（P or a t h J.、1992、Protein Expr. Purif.、3-26328 1）など）、固定免疫グロブリン上で精製するプロテインAドメイン、およびFLAG伸長／親和精製システム（Immunex Corp.、Seattle, WA）で利用されるドメインが含まれるが、これらに限定されない。

【0118】

融合タンパク質配列を除去するための融合タンパク質パートナーと目的のタンパク質配列との間のタンパク質分解性切断含むことも便利であり得る。例として、ScFv Abを切断して異種部分から精製することができるようにScFv Abをコードするヌクレオチド配列と異種タンパク質配列との間に切断部位を含むように融合タンパク質を操作することもできる。精製ドメインとScFv Abとの間に切断用リンカー配列（第XA因子またはエンテロキナーゼ（Inv it o r o g e n、San Diego, CA）など）を含めることも精製の簡素化に有用であり得る。好ましくは、融合タンパク質は、本発明のアミノ酸配列を含むScFv Abの結合特異性を妨げない。

【0119】

1つの好ましい実施形態では、融合タンパク質は、分泌同時刺激分子（SCM）を含むかコードする。

【0120】

SCM融合タンパク質

本発明の分泌同時刺激分子（SCM）は、哺乳動物細胞由来の分泌用のシグナルペプチドおよび免疫系細胞に対する同時刺激シグナルとして作用する少なくとも1つのさらなるドメインを含む操作融合タンパク質であり得る。異なる同時刺激ドメインを含むSCMの組み合わせの使用を予見することもできる。SCMを含むScFv Abを、治療個体の自己細胞でのSCMコード遺伝子の発現によって作製することができるので、宿主細胞によってタンパク質に添加した任意の翻訳後修飾は信頼でき、完全に機能的暗タンパク質および適切な薬物動態学が得られる。

【0121】

WO-A-92/00092は、哺乳動物細胞から分泌された膜貫通ドメインの前の翻訳終止コドンの置換に由来するB7-1の短縮形態を記載している。特定の場合、オンコスタチンM遺伝子由来の異種シグナルペプチドを使用した。WO-A-92/00092はまた、免疫グロブリンのFc領域に融合しているB7-1の細胞外ドメインを含む融合タンパク質を記載している。このような分子は、T細胞上のCD28に結合して、T細胞増殖を刺激するように作用することができる。しかし、B7またはB7誘導体が個体表面に固定されていない場合は中間の範囲でこのような刺激が起こる。

【0122】

Gerstmayerら(1997、J. Immunol.、158、4584～4590)は、ErbB2に特異的なScFvの後ろの酵母*Pichia pastoris*で発現された場合に分泌されるmycエピトープタグおよびポリヒスチジンタグへのB7-2の融合を記載している。この分子は、抗体への結合性およびPMAおよびIL-2で予備刺激されたT細胞の同時刺激増殖を維持していた。しかし、このような分子のグリコシル化はおそらくヒトにおける不適切な薬物動態学を誘導する酵母型である。

【0123】

本発明によれば、任意の適切な同時刺激ドメインを使用することができる。例として、同時刺激ドメインを、細胞表面糖タンパク質のB7ファミリーの細胞外部分(B7-1、B7-2、およびB7-3を含む)または他の同時刺激細胞表面糖タンパク質(同時刺激レセプターリガンド分子(CD2/LFA-3、LFA-1/ICAM-1、およびICAM-3を含む)などであるが、これらに限定されない)から選択することができる。研究により、単球によるT細胞刺激は、2つの各レセプターリガンド経路(CD2/LFA-3およびLFA-1/ICAM-1)に依存していることが示されている(Van Seventerら、1991、Eur. J. Immunol.、121、1711～1718)。さらに、ICAM-3(第3のLFA-1逆レセプター)が静止および活性化Tリンパ球の同時刺激分子であることが示されている(Hernandez-C

asellesら、1993、Eur. J. Immunol.、23、2799～2806）。

【0124】

他の可能な同時刺激分子には、同定されているSLAMと呼ばれる新規の糖タンパクシスレセプターを含み、拘束されている場合、CD28独立様式でのT細胞増殖を可能にし、Th0/Th1サイトカイン産生プロファイルを誘導する（Cocksら、1995、Nature、376、260～263）。

【0125】

CD6（細胞表面糖タンパク質）はまたは、T細胞上での同時刺激および接着レセプターとして機能することが示されている。4つのCD6イソ型（CD6a、b、c、d）が記載されている（Kobargら、1997、Eur. J. Immunol.、27、2971～2980）。ヒト記憶B細胞の活性化における超遅発性抗原（VLA-4）インテグリンの役割が提唱されている（Silvyら、1997、Eur. J. Immunol.、27、2757～2764）。内皮細胞により、活性化CD4T細胞の表現型に影響を与える固有同時刺激シグナルも得られる（Karmannら、1996、Eur. J. Immunol.、26、610～617）。優性な量インターロイキン-4（IL-4）およびIL-5ならびにわずかな量のIL-2およびγインターフェロンを放出させる休止T細胞に同時刺激を行うことができるリポ多糖類活性化B細胞の表面上に存在するB3タンパク質もまた記載されている（Vinayら、1995、J. Biol. Chem.、270、23429～23436）。T細胞および腫瘍細胞上での新規の同時刺激T細胞抗原（A6H）の同時発現により、これらの細胞の共通の性質に関して可能な機能が示唆されている（Labudaら、1995、Int. Immunol.、7、1425～1432）。

【0126】

本発明の1つの好ましい実施形態では、同時刺激ドメインは、B7-1またはB7-2の一部、より好ましくはB7-1またはB7-2の完全な細胞外タンパク質部分である。

【0127】

1つの好ましい実施形態では、本発明のS c F v A bを、DAM結合ドメインおよび同時刺激ドメインを含む融合タンパク質をコードする新規の遺伝子の発現によって形成する。本発明の文脈では、同時刺激ドメインをS c F vに融合させる。このドメインは、以下の順番（N末端からC末端）で存在することができる：抗原結合ドメインの後に同時刺激ドメインまたは同時刺激ドメインの後に抗原結合ドメイン。好ましくは、同時刺激ドメインを、N末端の後の高原結合ドメインに位置付ける。シグナルペプチドはN末端に含まれ、例えば、同時刺激細胞外ドメインの天然のシグナルペプチドであり得る。異なるドメインをさらなる配列によって分離することができるが、これはその構造を簡単にするか、ドメイン間のペプチドスパーサーとして作用するか、可動性ペプチドリッカーとして作用するか、別の機能を得るための新規の遺伝子中の都合のよい制限酵素切断部位の封入による。好ましくは、ドメインは可動性リンカーによって分離されている。

【0128】

異なるSCMをコードする2つ以上の異なる遺伝子を使用して、同時刺激または天然のT細胞の同時刺激および記憶応答の誘導の両方を改変することができる。例えば、B7-1細胞外ドメインを含むSCMをコードする遺伝子を、B7-2細胞外ドメインを含むSCMをコードする遺伝子と共に投与することができる。

【0129】

S c F v抗体産生の定量

マーカー遺伝子発現の有無により、ヌクレチド配列および／またはそのS c F v A bも存在し、その存在および発現を日常的手段によって確認することができることを示唆することができる。例えば、ヌクレオチド配列をコードするS c F v A bをマーカー遺伝子配列内に挿入する場合、S c F v A bコード領域を含む組換え細胞をマーカー遺伝子機能の非存在によって同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子を、1つのプロモーターの制御の下でヌクレオチド配列をコードするS c F v A bを縦列に置くことができる。誘導または選択に反応するマーカー遺伝子の発現は、通常S c F v A bの発現も示す。

【0130】

特定の細胞のさらなる発現定量法には、放射性標識 (Melby PCら、1993、J. Immunol. Methods、159、235～44) またはビオチン処理 (Duplaa Cら、1993、Anal Biochem.、229～36) ヌクレオチド、調節核酸の同時複製、および実験結果を挿入した検量線が含まれる。複数のサンプルの定量を、目的のScFv Abを種々の希釈度に調製して分光光度計および熱量測定によって迅速に定量するELISA形式でのアッセイによって高速化することができる。

【0131】

宿主／標的細胞

本発明のヌクレオチド配列を含む宿主および／または標的細胞を使用して、インビトロ、インビボ、およびエクスピボ条件下で本発明のScFv Abを発現させることができる。

【0132】

用語「宿主細胞および／または標的細胞」には、ベクターをトランスフェクトまたは形質導入することができる適切な生物由来の任意の細胞が含まれる。宿主および／または標的細胞の例には、インビトロ、インビボ、およびエクスピボ条件下で本発明のScFv Abを発現させることができる細胞を含み得るがこれらに限定されない。このような細胞の例には、マクロファージ、内皮細胞、またはその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。さらなる例には、呼吸道上皮細胞、肝細胞、筋細胞、心筋細胞、滑膜細胞、初代哺乳動物上皮細胞、および最終的有糸分裂後の非複製細胞 (マクロファージおよび／またはニューロンなど) が含まれる。

【0133】

好ましい実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。

【0134】

非常に好ましい実施形態では、細胞はヒト細胞である。

【0135】

用語「生物」には、任意の適切な生物が含まれる。好ましい実施形態では、生物は哺乳動物である。非常に好ましい実施形態では、生物はヒトである。

【0136】

本発明のS c F v A bを宿主細胞として原核細胞を使用して作製することができるが、真核細胞（例えば、酵母、昆虫、または哺乳動物細胞、特に哺乳動物細胞）を使用することが好ましい。適切な宿主細胞には、細菌（E. coliなど）、酵母、哺乳動物細胞株、および他の真核細胞株（例えば、昆虫S f 9細胞）が含まれる。

【0137】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列での宿主および／または標的細胞の形質転換を含む方法を提供する。

【0138】

用語「形質転換細胞」は、改変された遺伝子構造を有する宿主細胞および／または標的細胞を意味する。本発明では、細胞は本発明のベクター細胞に導入されている場合、改変された遺伝子構造を有する。

【0139】

宿主細胞および／または標的細胞を、本発明のS c F v A bを発現する適切な条件下で培養することができる。

【0140】

本発明はまた、形質転換宿主細胞を培養する工程を包含する方法を提供し、これはヌクレオチド配列によってコードされるS c F v A bの発現に適切な条件下で本発明のヌクレオチド配列で細胞を形質転換する。

【0141】

本発明はまた、形質転換宿主細胞の培養法を提供し、これは、ヌクレオチド配列によってコードされるS c F v A bの発現に適切な条件下で本発明のヌクレオチド配列またはその誘導体、ホモログ、変異型もしくは断片で細胞を形質転換し、前記形質転換宿主細胞培養物から前記S c F v A bを回収する。

【0142】

本発明のS c F v A bを、当該分野で公知の種々の技術（酵素、化学、および／または浸透圧溶解および物理的破壊を含む）によって宿主細胞から抽出することができる。S c F v A bを、それ自体が公知の様式において精製および単

離することができる。

【0143】

インビトロ／インビボ／エキスピボ発現の調節

本発明はまた、本発明の S c F v A b コードヌクレオチド配列をインビトロ／インビボ／エキスピボで調節する遺伝子療法を含む。例えば、本発明の S c F v A b コードヌクレオチド配列または本発明の S c F v A b コードヌクレオチド配列に関連する調節領域、または転写または翻訳速度を改変するための対応する RNA 転写物に結合する化合物の投与によって発現を調節することができる。

【0144】

コントロール配列

本発明の S c F v A b をコードする配列に作動可能に連結されたコントロール配列には、プロモーター／エンハンサーおよび他の発現調節シグナルが含まれる。これらのコントロール配列を、発現ベクターを使用するように設計された宿主細胞および／または標的細胞に適合するように選択することができる。例えば、さらなる転写調節エレメントの添加によってコントロール配列を改変して転写モジュレーターにより反応性を示すコントロール配列によって指向される転写レベルを得ることができる。

【0145】

作動可能に連結された

用語「作動可能に連結された」は、記載の成分がその意図する様式で機能するような関係であることを意味する。コード配列に「作動可能に連結された」調節配列を、コード配列がコントロール配列と適合する条件下で発現するような方法でライゲートする。

【0146】

好ましくは、本発明のヌクレオチド配列は、転写単位に作動可能に連結されている。

【0147】

本明細書中で使用される、用語「転写単位」は、コード配列および任意の他のコード配列から独立してコード配列を発現するためのシグナルを含む核酸領域で

ある。したがって、各転写単位は、一般に、少なくとも1つのプロモーター、最適なエンハンサー、およびポリアデニル化シグナルを含む。

【0148】

プロモーター

用語「プロモーター」は、当該分野で周知であり、当該分野の通常の意味で使用する（例えば、RNAポリメラーゼ結合部位）。この用語は、最小プロモーターから上流エレメントおよびエンハンサーのサイズおよび複雑さの範囲の核酸領域を含む。

【0149】

典型的には、プロモーターを、哺乳動物細胞で機能的なプロモーターから選択するにもかかわらず、原核生物プロモーターおよび他の真核細胞で機能的なプロモーターを使用することができる。プロモーターは、典型的には、ウイルスまたは真核生物遺伝子のプロモーター配列に由来する。例えば、発現する細胞のゲノム由来のプライマーであり得る。真核生物プロモーターに関して、これらは、遍在的様式（ α アクチン、 β アクチン、チューブリンなど）または組織特異的様式（ピルビン酸キナーゼ遺伝子のプロモーターなど）で機能するプロモーターであり得る。

【0150】

低酸素プロモーター／エンハンサー

エンハンサーおよび／またはプロモーターは、ScFv Abコードヌクレオチド配列が特定の目的の組織を優先的に発現する低酸素血症、虚血、または低グルコース環境（腫瘍、関節炎の関節、または他の虚血部位など）で優先的に活性であり得る。したがって、治療個体に対するScFv Abコードヌクレオチド配列の任意の有意な生物学的効果または副作用を減少または消滅させることができる。エンハンサーエレメントまたは発現を調節する他のエレメントは、複数のコピーに存在し得る。同様に、またはそれに加えて、エンハンサーおよび／またはプロモーターは、1つまたは複数の特異的細胞型（任意の1つまたは複数のマクロファージ、内皮細胞、またはその組み合わせなど）において優先的に活性であり得る。さらなる例には、呼吸気道上皮細胞、肝細胞、筋細胞、心筋細胞、滑

膜細胞、初代哺乳動物上皮細胞、および最終的有糸分裂後の非複製細胞（マクロファージおよび／またはニューロンなど）を含み得るが、これらに限定されない。

【0151】

組織特異的プロモーター

本発明のプロモーターは、組織特異的プロモーターであり得る。適切な組織限定プロモーター／エンハンサーの例は、腫瘍細胞で活性が高いもの（MUC 1 遺伝子、CEA 遺伝子または 5 T 4 抗原遺伝子由来のプロモーター／エンハンサーなど）である。一過性限定プロモーター／エンハンサーの例は、虚血および／または低酸素血症に反応を示すもの（低酸素血症反応エレメントまたは g r p 7 8 または g r p 9 4 遺伝子のプロモーター／エンハンサーなど）である。αフェトプロテイン（AFP）プロモーターもまた腫瘍特異性プロモーターである。1つの好ましいプロモーター／エンハンサーの組み合わせは、ヒトサイトメガロウイルス（h CMV）主要最初期（MIE）プロモーター／エンハンサーの組み合わせである。

【0152】

好ましくは、本発明のプロモーターは、組織特異的である。すなわち、プロモーターは、ある組織中で S c F v A b コードヌクレオチド配列を駆動することができる一方で、他の組織型に多数の「サイレント」が残存している。

【0153】

用語「組織特異的」は、1つの組織型に対する活性が限定されないが、ある組織群で活性であり、別の組織群であまり活性ではないという点で選択性を示すプロモーターを意味する。本発明のプロモーターの望ましい特徴は、プロモーターが標的組織でさえも活性化した低酸素血症調節エンハンサーエレメントの非存在下で比較的低い活性を有するという点である。これを行う1つの手段は、低酸素血症の非存在下で選択されたプロモーターの活性を抑制する「サイレンサー」エレメントを使用することである。

【0154】

用語「低酸素血症」は、特定の器官または組織の酸素の供給が不十分である状

態を意味する。

【0155】

特定のプロモーターの調節下での S c F v A b コードヌクレオチド配列の発現レベルを、プロモーター領域に操作によって調整することができる。例えば、プロモーター領域の異なるドメインは、異なる遺伝子調節活性を有し得る。これらの異なる領域の役割を、典型的には、特定の領域を欠失させた異なる種々のプロモーターを有するベクター構築物を使用して評価する（すなわち、欠失分析）。このアプローチを使用して、例えば、組織特異性を付与し得る最小の領域または低酸素血症の感受性を付与する最小領域を同定することができる。

【0156】

上記の多数の組織特異的プロモーターは、本発明の実施に特に有利であり得る。ほとんどの例では、これらのプロモーターを、選択したプロモーターのクローニングに適切な都合の良い制限消化断片として単離することができる。あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、プロモーター断片を単離することができる。増幅断片のクローニングを、プライマーの 5' 末端での制限部位の組み込みにより容易にすることができる。

【0157】

誘導プロモーター

本発明のプロモーターはまた、特異的刺激に反応するプロモーター（例えば、ステロイドホルモンレセプターに結合するプロモーター）であり得る。ウイルスプロモーターも使用することができる（例えば、モロニーマウス白血病ウイルス長末端反復（MMLV LTR）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター、またはヒトサイトメガロウイルス（CMV）IEプロモーター）。

【0158】

異種遺伝子の発現レベルを細胞寿命中に調節することができるように誘導可能なプロモーターも有利であり得る。誘導は、プロモーターを使用していた発現レベルを調節することができることを意味する。

【0159】

エンハンサー

さらに、これらの任意のプロモーターを、さらなる調節配列（例えば、エンハンサー配列）によって改変することができる。上記の2つ以上の異なるプロモーター由来の配列エレメントを含むキメラプロモーターを使用することもできる。

【0160】

用語「エンハンサー」には、転写開始複合体の他のタンパク質成分に結合してその会合プロモーターによって指向される転写の開始を促進するDNA配列が含まれる。

【0161】

本発明のScFv Abのインビトロ／インビボ／エキスピボ発現を、目的のタンパク質（POI）またはそれをコードする目的のヌクレオチド（NOI）と組み合わせて使用することができる。

【0162】

POI／ NOIの組み合わせ

本発明のScFv Abまたはそれをコードするヌクレオチド配列を、直接または例えば標的細胞または標的組織へのベクター輸送によってPOI（プロドラッグ活性化酵素など）と組み合わせて使用することができる。その代わりまたは標的組織での選択的発現で、本発明のScFv Abまたはそれをコードするヌクレオチド配列を、別のPOI（プロドラッグ活性化酵素など）またはプロドラッグ活性化酵素をコードする目的の1つまたは複数のヌクレオチド（NOI）と組み合わせて使用することができる。これらのプロドラッグ活性化酵素は、個体をプロドラッグ酵素が作用する1つまたは複数のプロドラッグで治療するまで有意な効果も副作用も示さない。活性なPOIまたはそれをコードするNOIの存在下では、適切なプロドラッグでの個体の治療により病態の緩和を促進することができる（H巢増殖または生存の減少など）。

【0163】

プロドラッグPOI

POI（プロドラッグ活性化酵素など）を、罹患部位（癌治療用の腫瘍部位など）に送達させることができる。この場合、適切なプロドラッグ活性化酵素と組

み合わせた適切なプロドラッグを患者の治療に使用する。適切なプロドラッグを、ScFv Abまたはそれをコードするヌクレオチド配列を含むベクターとともに投与することができる。プロドラッグの例には、以下が含まれる：リン酸エトボシド（アルカリホスファターゼを含む、Senterら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci.、85、4842～4846）；5-フルオロシチシン（シトシンデアミナーゼを含む、Mullenら、1994、Cancer Res.、54、1503～1506）；ドキソルビシン-N-p-ヒドロキシフェノキシアセトアミド（ペニシリン-V-アミダーゼを含む、Kerrら、1990、Cancer Immunol. Immunother.、31、202～206）；パラ-N-ビス（2-クロロエチル）アミノベンゾイルグルタマート（カルボキシペプチダーゼG2を含む）；セファロsporinナイトロジェンマスタードカルバマート（ β -ラクタマーゼを含む）；SR4233（P450レダクターゼを含む）；ガンシクロビル（HSVチミジンキナーゼを含む、Borrelliら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci.、85、7572～7576）；ニトロレダクターゼを含むマスタードプロドラッグ（Friedlosら、1997、J. Med. Chem.、40、1270～1275）、およびシクロホスファミド（P450を含む、Chenら、1996、Cancer Res.、1331～1340）。

【0164】

本発明での使用に適切なプロドラッグ活性化酵素の例には、5-フルオロウラシルプロドラッグカプセタインおよびフルツロンを活性化するチミジンホスホリラーゼ；ガンシクロビルを活性化させる単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ；DNA損傷薬に対するシクロホスファミドなどのプロドラッグを活性化するシトクロムP450；および5-フルオロシチシンを活性化するシトシンデアミナーゼが含まれる。好ましくは、ヒト起源のプロドラッグ活性化酵素を使用する。

【0165】

POIおよびNOI

本発明で使用する他の適切な目的のタンパク質（POI）またはそれをコード

するNOIには、以下の治療および／または診断に適用するものが含まれるがこれらに限定されない：サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、操作免疫グロブリン様分子、一本鎖交代、融合タンパク質、酵素、免疫同時刺激分子、免疫調整分子、アンチセンスRNA、標的タンパク質のトランス優性ネガティブ変異体、トキシン、条件的毒素、抗原、腫瘍抑制タンパク質および成長因子、膜タンパク質、血管作用タンパク質およびペプチド、抗ウイルスタンパク質およびリボザイムならびにその誘導体をコードする配列（関連するレポーター基などを含む）。含まれる場合、POIまたはそれをコードするNOIを、典型的には適切なプロモーター（リボザイムの発現を駆動するプロモーターまたは異なるプロモーター（1つまたは複数の特異的細胞型のプロモーターなど）であり得る）に作動可能に連結させることができる。

【0166】

バイスタンダー効果

POIおよび／またはそれをコードするNOIは、細胞から分泌されたタンパク質であり得る。あるいは、POI発現産物は分泌されず、細胞内で活性を示す。いずれかの事象では、POI発現産物はバイスタンダーエフェクターまたは離れたバイスタンダー効果（すなわち、共通の表現型を有する隣接または離れた（例えば、転移）さらなる関連細胞を死滅させる1つの細胞における発現産物の産生）を示すことが好ましい。

【0167】

癌治療または予防において本発明で使用する適切なPOIまたはNOIには、腫瘍抑制物質（野生型p53など）；抗腫瘍免疫機構のアクチベーター（サイトカイン、同時刺激分子、および免疫グロブリンなど）；血管新生のインヒビター；または薬物感受性を増大させるもの（プロドラッグ活性化酵素など）；天然のエフェクター細胞によって標的細胞の破壊を間接的に刺激するもの（例えば、免疫系を刺激するか前駆物質を標的細胞を破壊する有毒物質（例えば、プロドラッグ活性化酵素）に変換する強力な抗原）として作用する標的細胞（例えば、リボゾーム毒素）を破壊するタンパク質が含まれる。コードされたタンパク質もまた、バイスタンダー腫瘍細胞（例えば、分泌性抗腫瘍抗体ーリボゾーム毒素融合

タンパク質を使用する)を破壊し、バースタンダー細胞(例えば、免疫系または局所的血管閉塞を引き起こす凝固タンパク質を刺激するサイトカイン)の破壊を間接的に刺激し、前駆物質をバースタンダー腫瘍細胞破壊する有毒物質(例えば、プロドラッグを拡散性薬物に活性化する酵素)に変換することができる。

【0168】

また、(例えば、パーキトリンパ腫における異常なmyc転写物または慢性骨髄性白血病におけるbcr-abl転写物に対する)腫瘍を持続する細胞遺伝子の発現を干渉するアンチセンス転写物またはリボザイムをコードするNOIの送達。このようなPOIおよび/またはPOIの組み合わせもまた認識される。

【0169】

低酸素血症調節治療NOIの例を、PCT/GB95/00322(WO-A-9521927)に見出すことができる。

【0170】

ScFv Abカップリング

本発明のScFv Abを、標準的な方法を使用して他の分子にカップリングすることができる。ScFv Abのアミノ末端またはカルボキシ末端を、多数の技術(例えば、従来技術(チロシン残基-クロラミンT、ヨードゲン、ラクトペルオキシダーゼ、リジン残基-ボルトン-ハンター試薬))を使用した放射性標識)で放射性同位体を使用するか使用しないで標識することができる。これらのカップリング技術は当業者に周知である。カップリング技術をアミノ酸(アミノ、スルフヒドリル、カルボキシル、アミド、フェノール、およびイミダゾールが含まれるが、これらに限定されない)の利用可能な官能基に基づいて選択する。これらのカップリングを行うために使用する種々の試薬には、グルタルアルデヒド、ジアゾ化ベンジジン、カルボジイミド、およびp-ベンゾキノンが含まれる。

【0171】

化学的カップリング

本発明のScFv Abを、種々の用途(画像診断/予後、診断および/または治療が含まれるが、これらに限定されない)のために、同位体、酵素、キャリ

アタンパク質、細胞傷害薬、蛍光分子、放射性ヌクレオチド、および他の化合物に化学的にカップリングすることができる。カップリング反応効率を、特異的反応に適切な異なる技術を使用して同定する。例えば、S c F v A b ペプチドの¹²⁵I を用いた放射性標識を、特異性活性の高いクロミンTおよびNa¹²⁵I を使用して行う。メタバイスルファイトナトリウムで反応を停止させ、混合物を使い捨てカラムで脱塩する。標識ペプチドをカラムから溶出し、画分を回収する。各画分からアリコートを取り出し、ガンマカウンターで放射能を測定する。この様式では、未反応Na¹²⁵I を標識S c F v A b から分離する。特異的放射能が高いペプチド画分を次の使用まで保存する（S c F v A b への結合能力分析など）。

【0172】

画像診断

短命の同位体を含む本発明の標識S c F v A b の使用により、S c F v A b 結合部位を含む腫瘍を位置付けるためのオートラジオグラフィー、現代のラジオグラフィーまたは他の膜結合技術（放射型断層撮像法など）を使用したインビボでのDAM結合部位の視覚的定量が可能である。この適用により、重要な診断および／または予知研究ツールが得られる。

【0173】

コンジュゲート

他の実施形態では、本発明のS c F v A b を、放射性標識、細胞傷害性化合物または放射性同位体、無毒のプロドラッグの細胞傷害薬への変換用の酵素、得られたコンジュゲートが罹患部位（結腸腫瘍など）を標的とするように免疫系を活性化させる化合物、または細胞刺激化合物にカップリングさせる。このようなコンジュゲートは、本発明のS c F v A b からなる「結合部分」および放射性標識毒素または酵素からなる「官能部分」を有する。異なるS c F v A b を、いくつかの用途（S c F v A b に結合する細胞を特異的に殺すための細胞傷害薬へのS c F v A b の結合が含まれるが、これらに限定されない）に使用するために合成することができる。

【0174】

あるいは、特に別の化合物への結合を物理的に妨害することによりDAMの活性を簡単に妨害するために、ScFv Abを単独で使うことができる。

【0175】

コンジュゲート（ペプチドまたはポリペプチドである場合も）の結合部分および官能部分を、従来のポリペプチド架橋法（一般に、O' Sullivanら（Anal. Biochem.、1979、100、100～108）に記載の方法）によって互いに連結させることができる。例えば、一方の部分をチオール基で富化し、他方の部分をチオール基（例えば、ヨード酢酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHIA）またはN-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオナート（SPDP））と反応することができる二官能価薬と反応させることができる。例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルによるアミドおよびチオエーテルは、一般にジスルフィド結合よりもインビボにおいて安定である。

【0176】

あるいは、結合部分が炭水化物を含む場合（抗体またはいくつかの抗体断片など）、欧州特許第0088695号に記載の架橋技術を使用して炭水化物部分を介して官能部分を連結させることができる。

【0177】

コンジュゲートの官能部分は、無毒のプロドラッグの有毒薬物への変換用の酵素であり得る（例えば、Bagshaweと彼のグループのコンジュゲート（Bagshawe、1987、Br. J. Cancer、56、531；Bagshaweら（Br. J. Cancer、1988、58、700）、WO88/07378）またはシアニド放出系（WO91/11201））。

【0178】

コンジュゲート中、完全な酵素が存在する必要はないが、当然、触媒部分は存在しなければならない。触媒させたい反応に関連する化合物に対してScFv Abが惹起する場合、いわゆる「アプザイム」を使うことができる（通常、反応中間体の状態）。次いで、得られた抗体を反応用酵素として機能させることができる。

【0179】

コンジュゲートをサイズ排除または親和性クロマトグラフィーで精製し、二重生物活性について試験することができる。抗原免疫反応性を、固定抗原による酵素結合免疫測定法（ELISA）および生細胞放射免疫アッセイを使用して測定することができる。グルコース残基が加水分解された場合に吸光度が変化する基質（405 nmにおける吸光光度により測定される2-ニトロフェノールを遊離させるoNPT（o-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド）など）を使用して、β-グルコシダーゼについて酵素アッセイを使用してもよい。

【0180】

コンジュゲートの安定性を、最初に37℃の血清中でインキュベートし、その後サイズ排除FPLC分析を行うことによってインビトロで試験することができる。コンジュゲートの注射から種々の時間後での血清を分析することで、マウスと同一の方法により、インビボでの安定性を試験することができる。さらに、ScFv Abを¹²⁵Iで放射性標識し、抱合前に酵素を¹³¹Iで放射性標識し、コンジュゲート、遊離のScFv Ab、およびマウス中で遊離の酵素の体内分布を同定することができる。

【0181】

あるいは、他方のコンジュゲート部分に隣接するか、コンジュゲートの所望の性質を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されている2つのコンジュゲート部分をコードするそれぞれの領域を含むDNAによる、組換えDNA技術によって、コンジュゲートは融合物として作製することができる。

【0182】

おそらく、化合物の2つの官能部分は、完全または部分的に重複し得る。次いで、公知の方法において適切な宿主中でDNAを発現させた。

【0183】

診断キット

本発明はまた、生体流体および組織中のDAMの検出および測定ならびに組織中のDAMの位置付け用の診断法およびキットを含む。結合特異性の高い本発明のScFv Abを使用して、血漿、尿、組織、および細胞培養培地の抽出物中

におけるDAMの迅速で、信頼でき、高感度で特異的な測定および位置付けのための取り扱いの簡単なキットを確立することができる。本発明のScFv Abを、一定の状態で病態（インサイチュでの原発性腫瘍による微小転移など）の進行を示すことができる循環DAMの検出が可能な診断法およびキットで使用することもできる。

【0184】

これらのキットには、以下の技術を含み得るが、これらに限定されない：比較および非比較アッセイ、放射免疫アッセイ、生体発光および化学発光アッセイ、蛍光定量アッセイ、サンドイッチアッセイ、免疫放射測定アッセイ、ドットプロット、ELISAを含む酵素結合アッセイ、マイクロタイタープレート、尿または血液の迅速なモニタリング用の抗体被覆ストリップまたはディップスティック、および免疫細胞化学。各キットのために、アッセイの範囲、感度、精度、信頼性、特異性、および再生可能性を確認する。アッセイ内およびアッセイ間のばらつきを、置換または活性の検量線において20%、50%、および80%にする。

【0185】

研究所およびクリニックで共通に使用されているアッセイキットの1つの例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）キットである。ScFv Abの首尾のよい放射ヨウ素標識および精製後、適切な緩衝系中に比較的一定量の放射能（10,000 cpmなど）を含むチューブに、最も高い力価を有する抗血清をいくつかの希釈度で添加する。非特異的結合を同定するために、他のチューブは緩衝液あるいは免疫前血清を含む。4℃で24時間のインキュベーション後、プロテインAを添加して、チューブをボルテックスし、室温で90分間インキュベートし、4℃約2000～2500×gで遠心分離して標識ScFv Abに結合した抗血清の複合体を沈殿させた。上清を吸引して除去し、ペレット中の放射能をガンマカウンターで計数する。非特異的結合の除去後、標識ScFv Abの約10～40%に結合した抗血清希釈物をさらに特徴づける。

【0186】

免疫組織化学

組織および細胞中のDAMの位置付けのために免疫組織化学キットを使用することもできる。この免疫組織化学キットには、使用説明書、S c F v A b、およびおそらくブロッティングする血清および蛍光分子（フルオレセインイソチオシアナートなど）または一次抗血清を視覚化するために使用するいくつかの他の試薬を連結した二次抗血清が含まれる。免疫組織化学技術は当業者に周知である。この免疫組織化学キットにより、光学および電子顕微鏡を用いた組織切片および培養細胞中のDAMの位置付けが可能である。このキットは研究および臨床目的で使用されている。例えば、腫瘍を生検するか採取し、組織片をマイクロームで切断してDAM部位を試験する。このような情報は、癌などの検出および治療における診断およびおそらく治療目的に有用である。

【0187】

胎児細胞分析

本発明のS c F v抗体および／またはイヌ5 T 4配列はまた、母親の血液から胎児細胞の単離法に有用である。羊水検査の非侵襲性代用法として、母親の血液からの胎児細胞の単離が提唱されている（WO 97 / 3 0 3 5 4を参照のこと）。

【0188】

本発明のこの実施形態では、DAMは、母親および胎児細胞で異なるレベルで発現する任意の分子であり得る。好ましくは、DAMは、胎児細胞に排他的に発現する。5 T 4は非常に高いレベルで栄養膜に発現されることが知られている。したがって、5 T 4に対する抗体を使用して母親の血液から栄養膜を単離することができる。例えば、抗体は、本発明のS c F vまたは異なる種の5 T 4ポリペプチドに特異的な（例えば、惹起する）抗体であり得る。

【0189】

したがって、本発明はまた、本発明のS c F v抗体または異なる種由来の抗5 T 4抗体を使用した母親からの胎児細胞の単離法を提供する。本発明のイヌ5 T 4ポリペプチドは、このような交差反応抗体の作製に有用である。

【0190】

例えば、胎児細胞は、栄養膜または赤血球であり得る。

【0191】

母親／胎児細胞は、ヒトまたは動物由来であり得る。したがって、本発明の方法は、医学または獣医学用に使用することができる。好ましい実施形態では、母親および胎児は非ヒトであるので、単離法は獣医学上の適用の一部である。

【0192】

単離工程は、診断法の一部を形成し得る。例えば、胎児細胞を生化学または遺伝学サンプリングに供することができる。このような手順を使用すると、胎児の異常（ダウン症候群など）を試験するか、胎児の性を決定されるはずである。

【0193】

併用療法

本発明の S c F v A b を、他の疾患治療用組成物および手順と組み合わせて使用することができる。例として、S c F v A b を、癌などの疾患の従来の治療と組み合わせて使用することもできる。さらなる例として、微小転移の休止期を延長するか任意の残存原発性腫瘍を安定化するために、腫瘍を S c F v A b と組み合わせた従来の手術、照射、または化学療法で治療するか、治療後に患者に S c F v A b を投与することができる。

【0194】

S c F v A b 送達

S c F v A b を、治療薬と同時および同一部位に送達させることができる。あるいは、S c F v A b を治療薬と異なる時間および異なる部位に送達させることができる。病態（癌など）の予防および／または治療用の同一の送達媒介物中でさえも S c F v A b および治療薬を送達させることができる。

【0195】

S c F v A b の使用に基づく治療戦略には、DAM 反応性 S c F v A b 断片と細菌超抗原ブドウ球菌腸毒素との融合体の使用（D o h o s t e n ら、1994）または DAM および T 細胞 CD 3 抗原の両方を指向する二重特異性抗体の使用による T 細胞の漸増および活性化が含まれる。抗 DAM 抗体を異なる細菌毒素に結合させて強力な免疫毒素複合体を得ることもできる（L e M a i s t r e ら、1987、Z i m m e r m a n n ら、1997）。病態（血管新生

および／または癌)の予防および／または治療のために、S c F v A bを細胞傷害薬と組み合わせて使用することができる。S c F v A bに連結したリシン(r i c i n)などの細胞傷害薬は、S c F v A bに結合する細胞を破壊するためのツールを提供することができる。これらの細胞は、多数の場所(微小転移および原発性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない)に見出すことができる。

【0196】

スクリーニング

本発明のS c F v A bまたはその誘導体もしくはホモログおよび／または本発明のS c F v A bを発現する細胞株またはその誘導体もしくはホモログを使用して、S c F v A bの結合特異性に影響を与えることができる薬剤(ペプチド、有機または無機分子)をスクリーニングすることができる。

【0197】

1つの実施形態では、本発明のスクリーニングにより、本発明のS c F v A bのアゴニストおよび／またはアンタゴニストを同定することができる。

【0198】

別の実施形態では、本発明のS c F v A bを、種々の薬物スクリーニング技術で 사용할 ことができる。このような試験で使 用したS c F v A bは、溶液中で遊離しているか、固体支持体に固定されているか、細胞表面上に存在するか、細胞内に存在し得る。

【0199】

S c F v A b結合特異性の消滅またはS c F v A bと試験薬剤との結合複合体の形態を測定することができる。

【0200】

別のスクリーニング技術により、S c F v A bに対する適切な結合親和性を有する薬剤の高処理スクリーニング(HTS)が得られ、これはWO84/03564に記載の方法に基づく。

【0201】

本発明のアッセイは試験化合物の小規模および大規模スクリーニングならびに

定量アッセイに適切であると予想される。

【0202】

ファージディスプレイスクリーニング

本発明のScFv Abによって拘束可能なDAMなどの薬剤の同定でファージディスプレイを使用することができる。ファージディスプレイは、組換えバクテリオファージを利用する分子スクリーニングのプロトコルである。この技術は、標的ScFv Ab（またはその誘導体もしくはホモログ）またはそれをコードするヌクレオチド配列（またはその誘導体もしくはホモログ）と反応することができる適切なリガンド（候補DAMなど）をコードするヌクレオチド配列でバクテリオファージを形質転換する工程を含む。形質転換バクテリオファージ（好ましくは固体支持体に固定されている）は、適切なリガンド（候補薬剤など）を発現し、そのファージ被覆上にディスプレイされる。候補DAMを認識する標的ScFv Ab分子を保有する単位（細胞など）を単離および増幅する。次いで、得られた候補DAMを特徴付ける。

【0203】

本発明のScFv AbによるDAMを発現する細胞の標的化により、DAMを発現する細胞の活性を調整するためのScFv Abの開発が容易になる。

【0204】

本発明の別の実施形態では、ScFv Abライブラリーを使用して、特定のDAMに対する抗体をスクリーニングすることができる。例として、標的DAM（またはその誘導体もしくはホモログ）またはそれをコードするヌクレオチド配列（またはその誘導体もしくはホモログ）と反応することができる適切なリガンド（候補ScFv Abなど）をコードするヌクレオチド配列で、バクテリオファージを形質転換することができる。形質転換バクテリオファージ（好ましくは固体支持体に固定されている）は、適切なリガンド（候補ScFv Abなど）を発現し、そのファージ被覆上にディスプレイされる。候補ScFv Abを認識する標的DAM分子を保有する単位（細胞など）を単離および増幅する。次いで、得られた候補DAMを特徴付ける。

【0205】

さらなる例として、10xライブラリーベクター由来の合成重鎖および軽鎖可変部（VHおよびVL）のファージミドベクターpHEN2への再クローニングによって、「グリフィン1ライブラリー」と呼ばれるヒトScFv断片ライブラリーが構築されている。溶出およびスクリーニング手順の修正により、広範な種々のDAMに対するScFv抗体についてのファージディスプレイライブラリーが首尾よくスクリーニングされる（Bruinら、1999、Nature Biotechnology、17、397～399を参照のこと）。ファージディスプレイは、標準的な親和性リガンドスクリーニング技術を超える利点を有する。ファージ表面に三次元立体配置、その天然に存在する高次構造により密接に類似する候補薬剤をディスプレイする。これにより、特異的且つ親和性の高い結合のスクリーニングが可能である。

【0206】

模倣物のアッセイ

ファージディスプレイを使用したDAMまたはScFv Abのいずれかの明白な同定により、同一または類似の様式で活動することができる模倣物を同定するための組み合わせライブラリーの使用が容易になり得る。本発明のDAMに関連する疾患の治療のために、このような模倣物を単独または他の治療薬と組み合わせ投与することができる。

【0207】

投薬量

本発明のScFv Abの投薬量は、病態または治療条件および他の臨床因子（体重およびヒトまたは動物の体重および条件および化合物の投与経路など）に依存する。特定の動物またはヒトにおけるScFv Abの半減期に依存して、ScFv Abを1日あたり数回から週1回投与することができる。本発明は、ヒトおよび動物に適用されると理解される。本発明の方法は、同時または長期にわたって投与される単回および複数回投与を意図する。

【0208】

製剤

非経口投与に適切な製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、および製剤を意図

するレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る滅菌注射水溶液および非水溶液、ならびに、懸濁剤および増粘剤を含み得る水性または非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単回用量または複数回用量コンテナ（例えば、シールしたアンプルおよびバイアル）中に入れることができ、滅菌液体キャリア（例えば、注射用の水）を使用直前に添加することだけが必要なフリーズドライ（凍結乾燥）条件で保存することができる。即席注射溶液および懸濁液を、以前に記載の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調整することができる。

【0209】

本発明のScFv Abは、癌関連疾患などの疾患の予防および／または治療に有効であり得る。本発明は、有効量の本発明のScFv Abでの癌関連疾患などの疾患の治療法を含む。本発明のScFv Abを、当業者に公知の処方法を使用して、薬学的に受容可能な組成物中の合成ペプチドまたは単離および実質的に精製されたタンパク質またはその断片もしくは組み合わせとして得ることができる。これらの組成物を、標準的な経路で投与することができる。これらには、以下が含まれるが、これらに限定されない：経口、直腸、眼（硝子体内または眼房内を含む）、経鼻、局所（口腔内および舌下を含む）、子宮内、腔内または非経口（皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、皮内、頭蓋内、気管内、および硬膜外を含む）、経皮、腹腔内、頭蓋内、脳室内、大脳内、腔内、子宮内、または非経口（例えば、静脈内、髄腔内、皮下、または筋肉内）経路。

【0210】

ScFv Ab製剤は、有利には、単位投薬形態で存在し、従来の薬学的技術によって調製することができる。このような技術には、有効成分および薬学的キャリアまたは賦形剤を組み合わせる工程が含まれる。一般に、有効成分の液体キャリアまたは細かく砕いた固体キャリアまたはその両方との均一で密接な組み合わせおよび必要ならば生成物の形成によって製剤を調製する。

【0211】

さらに、本発明のScFv Abを化合物を徐放させる生分解性ポリマーに組み込むことができ、このポリマーは、薬物送達が望まれる付近（例えば、腫瘍部位）に移植するか、ScFv Abが全体的に徐放するように移植することがで

きる。生分解性ポリマーおよびその使用は、例えば、Bremら（J. Neurosurg, 1991, 74, 441～446）に詳細に記載されている。浸透圧ミニポンプを使用して、目的の部位（転移性増殖に直接投与するかその腫瘍に供給する血管など）へのカニューレを介した高濃度のScFv Abの送達を調節することもできる。

【0212】

本発明のScFv Abを所望の位置への送達を最大にするように設計された様式で注入される細胞傷害薬に結合させることができる。例えば、リシン結合高親和性ScFv Abを、カニューレを介して標的部位に供給する血管に送達させるか、標的に直接送達させる。このような薬剤を、注入カニューレに接続された浸透圧ポンプを介した制御様式で送達させる。

【0213】

好ましい単位用量製剤は、上記のように投与成分の一日量または単位、一日量以下、またはその適切な分画を含むものである。特に上記の成分に加えて、本発明の製剤は、問題になっている製剤の型を有する当該分野の他の従来の薬剤を含み得ると理解すべきである。

【0214】

ScFv Abコンジュゲートを、任意の適切な方法（例えば、希釈剤およびキャリアの標準的な滅菌非発熱性製剤（例えば、静脈内投与の場合、等張生理食塩水）での静脈内または腹腔内投与）で投与することができる。一旦ScFv Abコンジュゲートが標的細胞に結合し、（必要に応じて）血流から除去されると（典型的には約1日）、通常単回注入用量としてプロドラッグが投与されるか腫瘍を画像処理する。必要ならば、ScFv Abコンジュゲートは免疫原性であるので、シクロスポリンまたはいくつかの他の免疫抑制薬を投与して投与期間を延長することができるが、通常これは必要ない。

【0215】

コンジュゲートの疾患／正常組織比（少なくとも以下の静脈内送達）が約4～6日後に最も高い一方で、このときのDAMに結合したコンジュゲートの絶対量（グラムあたりの注射用量%として）がより早い時間より低いので、ScFv

Abとプロドラッグの投与タイミングを日常的な方法で至適化することができる。

【0216】

したがって、ScFv Abコンジュゲートとプロドラッグとの至適投与間隔は、疾患部位での酵素のピーク濃度と疾患組織と正常組織との間分布比との間の妥協点である。ScFv Abコンジュゲートの投薬量を、通例の基準に従って医師が選択する。少なくとも標的化酵素（ β グルコシダーゼなど）および有毒プロドラッグとしての静脈内アミグダリンを使用する場合、 $0.1 \sim 10.0 \text{ g/m}^2$ 体表面、好ましくは $1.0 \sim 5.0 \text{ g/m}^2$ の1日量を1～50日間が適切なのである。経口治療では、 $0.05 \sim 10.0 \text{ g}$ 、好ましくは $1.0 \sim 5.0 \text{ g}$ の1日量を1～50日が適切であり得る。ScFv Abコンジュゲートの投薬量を通常の基準、特に疾患組織の型、段階、および位置、および患者の体重を参考にして同様に選択する。治療期間は、ScFv Abコンジュゲートに対する任意の免疫反応の速度および範囲に一部依存する。

【0217】

ScFv Abコンジュゲートを診断に使用する場合、ScFv Abコンジュゲートの機能部分は、通常、シンチグラム研究用（例えば、テクネチウム 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) またはヨウ素 123 (^{123}I)）、核磁気共鳴（nmr）画像処理（核磁気共鳴画像法としても公知）用のスピトラベル（ヨウ素 123 、ヨウ素 313 、インジウム 111 、フルオリン 19 、炭素 13 、窒素 15 、酸素 17 、ガドリニウム、マンガン、または鉄）の放射性原子を含むかそれらからなる。

【0218】

例えば腫瘍の選択的破壊に化合物を使用する場合、ScFv Abの機能部分は、隣接細胞の破壊に十分なエネルギーを放出する放射性の高い原子（ヨウ素 131 、レニウム 186 、レニウム 188 、イットリウム 90 、または鉛 212 ）、または細胞傷害性化合物（メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ダウノルビシンなど）または他の挿入薬を含み得る。

【0219】

放射性標識または他の標識を公知の方法でScFv Abに組み込むことができる。例えば、ペプチドを生合成するか、適切なアミノ酸前駆体（例えば、フルオリン19を含む）を水素の代わりに使用するアミノ酸化学合成によって合成することができる。^{99m}Tc、¹²³I、¹⁸⁶Rh、¹⁸⁸Rh、および¹¹¹Inなどの標識をペプチド中のシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム90を、リジン残基を介して結合することができる。IODOGEN法（Frakerら、1978、Biochem. Biophys. Res. Commun.、80、49～57）を使用して、ヨウ素123を組み込むことができる。「免疫シンチグラフィにおけるモノクローナル抗体」（Chatal、CRC Press、1989）には他の方法が詳細に記載されている。

【0220】

医薬組成物

1つの態様では、本発明は、本発明のScFv Abおよび任意選択的に薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤（その組み合わせを含む）を含む医薬組成物を提供する。

【0221】

医薬組成物は、ヒトおよび獣医学用薬物においてヒトまたは動物用であり、典型的には任意の1つまたは複数の薬学的に受容可能な希釈剤、キャリア、または賦形剤を含む。治療用の受容可能なキャリアまたは希釈剤は、薬学分野で周知であり、例えば、「レミントンの薬学」、Mack Publishing Co.、（A. R. Gennaro編、1985）に記載されている。薬学的キャリア、賦形剤、または希釈材の選択を、意図する投与経路および標準的な薬学的業務に関して選択することができる。医薬組成物は、キャリア、賦形剤、または希釈剤、任意の適切な結合剤、潤滑剤、懸濁剤、被覆剤、溶解剤を含み得る。

【0222】

保存剤、安定剤、色素、および香料でさえも医薬組成物中に含めることができる。保存剤の例には、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、およびp-ヒドロキシ安息香酸が含まれる。抗酸化剤および懸濁剤も使用することができる。

【0223】

異なる送達系に依存する様々な組成物／製剤の要件が存在し得る。例として、本発明の医薬組成物を、ミニポンプを使用するか粘膜経路（例えば、鼻用スプレーまたは吸引用エアゾール）または経口用溶液、または組成物が例えば静脈内、筋肉内、または皮下経路での送達用の注射用形態で送達させるように処方することができる。あるいは、製剤を、両方の経路で送達されるように設計することができる。

【0224】

医薬組成物が胃腸粘膜を介して粘膜から送達される場合、胃腸管を介した通過中に安定性を維持することができるはずであり、タンパク質分解に耐性を示し、酸性pHで安定であり、胆汁の洗浄効果に耐性を示すはずである。

【0225】

適切ならば、医薬組成物を、吸入、座薬またはペッサリーの形態で、ローション、溶液、クリーム、軟膏、または粉剤の形態で局所的に、皮膚パッチを使用して、デンプン、ラクトース、またはチョークなどの賦形剤を含む錠剤の形態での経口で、または単独または賦形剤との混合物としてのカプセルまたは腫座薬で、または香料または着色料を含むエリキシル、溶液、または懸濁液の形態で投与することができるか、非経口（例えば、静脈内、筋肉内、または皮下）で注射することができる。非経口投与のために、組成物を、他の物質（例えば、血液と等張の溶液の作製に十分な塩または単糖類）を含み得る滅菌水溶液の形態で最良に使用することができる。口腔内または舌下投与のために、従来の様式で処方することができる錠剤またはロゼンジの形態で組成物を投与することができる。

【0226】

投与

典型的には、医師が個体に最も適切な実際の投薬量を決定し、これは、特定の患者の年齢、体重および反応、および病態の重症度によって変化する。以下の投薬量は、平均的な場合の例である。勿論、個体によってはより高いか低い用量範囲が有利である場合もあり得る。

【0227】

本発明の組成物（またはその一部の成分）を経口投与することができる。さら

に、またはその代わりとして本発明の他の組成物（またはその一部の成分）を注射で直接投与することができる。さらに、またはその代わりとして本発明の他の組成物（またはその一部の成分）を注射で局所投与することができる。さらに、またはその代わりとして本発明の他の組成物（またはその一部の成分）を注射で吸入で投与することができる。さらに、またはその代わりとして本発明の他の組成物（またはその一部の成分）を1つまたは複数の非経口、粘膜、筋肉内、静脈内、皮下、眼内、または経皮投与手段で投与することもでき、このような投与のために処方される。

【0228】

さらなる例として、本発明の医薬組成物を1～10回/日（1回または2回/日など）の投薬計画にしたがって投与することができる。任意の特定の患者用の特定の投与レベルおよび投薬頻度は変化し、種々の因子（使用した特定の化合物の活性、化合物の代謝安定性および作用期間、年齢、体重、身体全体の健康、性別、食事、投与様式および時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、特定の疾患の重症度、および宿主が受ける治療を含む）に依存する。

【0229】

用語「投与する」には、粘膜経路（例えば、鼻用スプレーまたは吸引用エアゾールまたは注入溶液として）、送達が生体組織の場合の非経口（例えば、静脈内、筋肉内、または皮下経路など）も含まれるが、これらに限定されない。

【0230】

したがって、本発明の医薬組成物を、1つまたは複数の以下の経路で投与することができる：経口投与、注射（直接注射など）、局所、吸入、非経口投与、粘膜投与、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、眼内投与、または経皮投与。

【0231】

疾患

有効量のScFv Abおよび/またはそれをコードするNOIを含む医薬組成物を、疾患（WO-A-98/09985に記載の疾患など）の治療に使用することができる。参照を容易にするために、リストの一部を以下に示す：マクロファージ阻害および/またはT細胞阻害活性、抗炎症活性；抗免疫活性（すなわ

ち、細胞および／またはヒト免疫応答（炎症に関連しない応答を含む）に対する阻害効果）；ウイルスおよび／または他の細胞内病原体に関連する疾患；マクロファージおよびT細胞の細胞外基質成分およびフィブロネクチンへの接着能力の阻害およびT細胞における f a s レセプター発現の上方制御；望ましくない免疫反応の阻害および炎症（慢性関節リウマチを含む炎症）、過敏症に関連する炎症、アレルギー反応、喘息、全身性エリテマトーデス、膠原病、および他の自己免疫疾患に関連する炎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化、動脈硬化性心臓病、再灌流損傷、心停止、心筋梗塞、血管炎症疾患、呼吸困難症候群、または他の心配疾患に関連する炎症、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎、および胃腸管の他の疾患、肝線維症、肝硬変、または他の肝疾患、甲状腺炎、または他の腺疾患、糸球体腎炎、または他の腎臓および泌尿器疾患、耳炎または他の耳鼻咽喉疾患、皮膚炎または他の皮膚疾患、歯周病または他の歯の疾患、精巣炎または精巣上体炎、不妊症、睾丸外傷または他の免疫関連精巣疾患、胎盤機能疾患、胎盤機能不全、習慣性中絶、子癇、子癇前症、および他の免疫および／または炎症関連婦人病、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、ブドウ膜網膜炎、視神経炎、眼内炎症（例えば、網膜炎または類囊胞黄斑部浮腫）、交感性眼炎、強膜炎、網膜色素変性症、変性眼低疾患の免疫および炎症成分、眼外傷、感染による目の炎症、増殖性硝子体網膜炎、急性虚血性視神経症、例えば緑内障濾過手術後の過剰な癒痕、眼移植片に対する免疫および／または炎症反応および炎症関連眼疾患に関連する炎症、中枢神経系（CNS）または他の器官における自己免疫疾患または病態または疾患に関連する炎症（免疫および／または炎症抑制が有利である）、パーキンソン病、パーキンソン病治療由来の合併症および／または副作用、AIDS関連痴呆複合体HIV関連脳症、デビック病、シドナム舞踏病、アルツハイマー病およびCNSの他の変性疾患、病態、または疾患、ストークス、ポリオ後症候群、の免疫および炎症成分、精神病、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性汎脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギラン＝バレー症候群、シドナム舞踏病、重症筋無力症、偽腫瘍大脳、ダウン症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、CNS圧迫またはCNS外傷またはCNSの感染の炎症成分、筋萎縮症およびジストロフィーの炎症性分、免

疫および炎症関連疾患、中枢および末梢神経系の病態または疾患、外傷後炎症、敗血症性ショック、感染症、手術、骨髄移植の炎症合併症または他の移植合併症および／または副作用、遺伝子治療の炎症および／または免疫合併症および副作用（例えば、ウイルスキャリアでの感染による）、または体液性および／または細胞性免疫応答を抑制または阻害するため、単球またはリンパ球数の減少によって単球または白血球増殖疾患（例えば、白血病）を治療または緩和するため、天然または人工細胞、組織、および器官（角膜、骨髄、器官、レンズ、ペースメーカー、天然または人口の皮膚組織など）の移植の際の移植片拒絶の予防および／または治療用のAIDS関連炎症。特定の癌関連疾患には、以下が含まれるが、これらに限定されない：固形腫瘍；血液および骨の腫瘍（白血病など）、腫瘍転移、良性腫瘍（例えば、血管種）、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫、慢性関節リウマチ、感染、眼球血管新生疾患（例えば糖尿病網膜症、未熟な網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオシスなど）；オスラーウェバー症候群；心筋血管新生；プラーク心血管新生；毛細血管拡張症、血友病関節、血管線維症、創傷肉芽形成、冠状動脈側副枝；脳側副枝；動静脈形成異常；虚血性枝芽血管新生；新生血管緑内障；水晶体後線維増殖症；糖尿病心血管新生；ヘリオバクター関連疾患、骨折、血管形成、造血、排卵、月経、および胎盤形成。

【0232】

実施例

実施例1-5T4ScFv Abおよびレトロウイルスの構築-腫瘍へのベクターの送達

マウス5T4モノクローナル抗体をコードするcDNAをクローン化し、標準的な技術によって配列決定する（「抗体操作：実際的アプローチ」、McCaffertyら編、1996、OUP）。抗体の可変部の配列を使用してScFv抗体を構築することができる。5T4ScFv. 1と呼ばれる5T4ScFvのコード配列（配列番号1）を図1に示す。この分子では、DNA配列は、マウス5T4モノクローナル抗体由来のVH、その後ろに15アミノ酸可変性リンカーおよびマウス5T4抗体のVL領域をコードする。可変性リンカーは、3コピー

のアミノ酸配列 `g l y - g l y - g l y - g l y - s e r` をコードし、反復を含むプラスミドが *E. coli* 中で増殖する場合に反復間の組換えの危険性を回避するために反復の間のDNA配列類似性を最小にしている。

【0233】

DNAカセット

カセット1－翻訳開始シグナルおよびシグナルペプチド

正確な翻訳開始および哺乳動物細胞からの分泌を行うために、以下の配列を使用した。

【化1】

**aaagcttCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT
ACAGGTGTCCACTCC**

【0234】

これは、発現ベクターでのクローニングに都合のよい *Hind* III 制限部位（小文字）、哺乳動物細胞のコンセンサス翻訳開始シグナル（*ANNA*TGPu）、および免疫グロブリン遺伝子由来のシグナル配列のコード配列を含む。

【0235】

カセット2－*s c F v*

5 T 4 *S c F v*. 1 の分泌部分の配列を図1に示す。この分子を、*V h*－(*g l y*₄－*s e r*)₃リンカー－*V 1*として示すことができる。

【0236】

5 T 4 *S c F v* 2 *Ab* は、*V 1*－可変性リンカー*V h* の順番で連結した 5 T 4 可変部配列からなる。この場合、リンカーは、20アミノ酸ペプチド (*g l y*₄－*s e r*)₄ をコードする。より長いリンカーにより、*V* 領域セグメントがこの順番で存在する場合に *S c F v* の組み立てが改良される。（*Pluckthun* ら、「抗体操作：実際のアプローチ」、*McCafferty* ら編、1996、OUP）。

【0237】

5 T 4 特異的 *S c F v* の発現

ヒト細胞中での5T4特異的ScFvの発現のために、強力プロモーターおよびポリアデニル化シグナルの調節下で、コード配列をベクターpCIneo (Promega) に挿入する。コード領域の5'末端でカセット1由来の翻訳開始シグナルおよび免疫グロブリンリーダー (シグナルペプチド) 配列により、哺乳動物細胞由来のScFvの有効な分泌を確保する。

【0238】

実施例2-ScFv Abをコードする発現ベクターでのマクロファージ/単球のトランスフェクション

【0239】

標準的な技術手順 (SandlieおよびMichaelsen、1996、「抗体操作：実際的アプローチ」、McCaffertyら編、第9章) による実験室規模および水簸 (例えば、CellProのCeptrate) により大規模で、末梢血単球細胞をヒト末梢血から単離する。接着細胞 (本質的に単球) をプラスチックへの一晚の接着によって富化し、接着細胞の1~3週間の培養によってマクロファージ分化経路に沿って細胞を分化させることができる。

【0240】

単球およびマクロファージをヒト細胞中でScFv Abを発現することができる発現ベクターでトランスフェクトする。構成性高レベル発現のために、ScFv AbをhCMV-MIEプロモーター-エンハンサーであるpCI (Promega) を利用するベクター中で発現させる。低酸素血症誘導発現のために、hCMVプロモーターを少なくとも1つのHREを含むプロモーターと置換する。適切なプロモーターは、3コピーのマウスPGK HREを有する短縮HSV TKプロモーターである (Firthら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci.、91、6496~6500)。

【0241】

種々のトランスフェクション法を使用して、ベクターを単球およびマクロファージに移入することができ、この方法には、粒子媒介DNA送達 (biolistics)、電圧ポレーション、陽イオン物質媒介トランスフェクション (例えば、Superfect、Qiagenの使用) が含まれる。各製造者が

指定した最適な結果を得るために変化するパラメータを考慮して製造者の指示に従ってこれらの各方法を行う。あるいは、欠陥アデノウイルスベクター (Microbix Inc. または Quantum Biotechnologies Inc.) などのウイルスベクターを使用することができる。

【0242】

実施例3-B7-ScFv融合タンパク質の構築

B7-1の細胞外ドメインを、天然のヒトB7-1タンパク質のアミノ酸残基1~125によって定義する。この配列をシグナルペプチドコード配列と共に使用して、5T4モノクローナル抗体由来のScFvも含む分泌融合タンパク質を構築する。5T4ScFvの配列を図1に示す。

【0243】

標準的な分子生物学技術を使用して、ヒトB7-1のアミノ酸215の後に5T4ScFvのN末端を融合した融合タンパク質をコードするDNAコード領域を構築する。このコード配列B7-1. 5T4. 1 (配列番号7) の配列を図2に示す。融合タンパク質は、B7-1配列と5T4ScFv配列との間に可変性 (gly-gly-gly-gly-ser) スペーサーを含む。リンカー挿入末端 (ヌクレオチド733からはじまる) での従来のBamHI制限部位の導入により、さらなるリンカーが二機能性融合タンパク質の最適な発現をスクリーニング可能である。図3は、融合タンパク質の略図を示す。同様に、ScFvがN末端であり、B7細胞外ドメインがC末端であるB7-1. 5T4. 2 (図3b) を構築可能である。この場合、成熟B7-1のコード配列のみ (シグナルペプチドを含まない) が必要である。この例では、免疫グロブリンリーダー配列などのシグナルペプチドを、ScFvのN末端に付加する。

【0244】

B7-2の同時刺激細胞外ドメインを使用する融合タンパク質のために (Gerstmaierら、1997、J. Immunol.、158 (10)、4584~90)、B7-1配列の代わりにB7-2のシグナルペプチドおよび細胞外ドメインを使用する。図4は、SCM B7-2. 5T4. 1同時刺激ドメインのコード配列を示す。これは、そのシグナルペプチドの前のヒトB7-2の最

初の225アミノ酸および可変性リンカー（gly₄-ser）をコードする。この配列の末端でBamHI部位を使用して、5T4ScFv. 1の上流のドメインを挿入することができる。この配列には、B7-2ドメインが融合タンパク質のN末端であるこの融合タンパク質を分泌することができるためのB7-2シグナルペプチドが含まれる。

【0245】

各構築されたcDNAを、哺乳動物培養細胞中で発現する哺乳動物発現ベクターpCIに挿入する。この目的のために、pCIのポリリンカーへの挿入用の都合のよい制限部位を移入し、第1のATGコドンのすぐ隣に翻訳開始シグナルCCACCを添加したコード配列の5'末端に、リンカー配列を付加する。pCI中の構築物を適切な哺乳動物宿主細胞株（COS-1など）にトランスフェクトしてSCMの配列を確認する。pCI由来の転写カセットまたは転写カセットの適切なセグメントを治療用の遺伝子送達系として使用される発現ベクターにサブクローニングする。

【0246】

実施例4-分泌同時刺激分子（SCM）を含むScFv Abをコードする発現ベクターでのマクロファージ/単球のトランスフェクション

標準的な技術手順（SandlieおよびMichaelsen、1996、「抗体操作：実際的アプローチ」、McCaffertyら編、第9章）による実験室規模および水簸（例えば、CellProのCeptrate）により大規模で、末梢血単球細胞をヒト末梢血から単離する。接着細胞（本質的に単球）をプラスチックへの一晩の接着によって富化し、接着細胞の1～3週間の培養によってマクロファージ分化経路に沿って細胞を分化させることができる。

【0247】

単球およびマクロファージをヒト細胞中でSCMを含むScFv Abを発現することができる発現ベクターでトランスフェクトする。構成性高レベル発現のために、SCMをhCMV-MIEプロモーター-エンハンサーであるpCI（Promega）を利用するベクター中で発現させる。低酸素血症誘導発現のために、hCMVプロモーターを少なくとも1つのHREを含むプロモーターと置

換する。適切なプロモーターは、3コピーのマウスPGK HREを有する短縮HSV TKプロモーターである(Firthら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci.、91、6496～6500)。

【0248】

種々のトランスフェクション法を使用して、ベクターを単球およびマクロファージに移入することができ、この方法には、粒子媒介DNA送達(biolistics)、エレクトロポレーション、陽イオン物質媒介トランスフェクション(例えば、Superfect、Qiagenの使用)が含まれる。各製造者が指定した最適な結果を得るために変化するパラメータを考慮して製造者の指示に従ってこれらの各方法を行う。あるいは、欠陥アデノウイルスベクター(Microbix Inc. またはQuantum Biotechnologies Inc.)などのウイルスベクターを使用することができる。

【0249】

実施例5-CTLA-4および5T4-抗原発現細胞に結合するSCMの分析
ScFv Ab-SCM融合タンパク質のB7-1またはB7-2ドメインは、ヒトT細胞所運存在するCD28およびCTLA-4に特異的に結合すると予想される。T細胞またはヒトCTLA-4またはCD28でトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣細胞への結合を、以下のようにFACS分析を使用して同定する。 5×10^5 のCTLA-4発現標的細胞またはCTLA-4を欠く等価の細胞(非トランスフェクトCHO細胞)を、SCM遺伝子で一過性トランスフェクトしたCOS-1細胞由来の0.1mlの培養上清と共に4℃で1時間インキュベートする。細胞を洗浄し、B7ドメインに特異的な1mgのモノクローナル抗体(例えば、Ma b 9E10)とのインキュベーション後、FITC標識ヤギ抗マウスIgG(Pharmacia)を添加し、FACS分析する。

【0250】

5T4抗原のScFvの結合を、標的細胞発現5T4抗原(5T4トランスフェクト/A9細胞)またはコントロール細胞(A9)を使用して同様に評価する。

【0251】

実施例6—同時刺激活性の分析

HC11細胞などのBalb/c起源の確立されたマウス細胞を、発現ベクターpCIneoに挿入されたヒト5T4抗原(Myersら、1994、J. Biol. Chem.、269、9319～9324)をコードするcDNAでトランスフェクトする。

【0252】

Balb/cマウス由来の脾臓T細胞を、標準的な手順(JohnstoneおよびThorpe、1996、「免疫化学」、Blackwell、第4章)で単離する。10ng/ml PMA(Sigma)および100U/mlヒトIL-2(Boehringer Mannheim)を含む培地中での1～2日間のインキュベーションによってT細胞を予備刺激する。SCM遺伝子でトランスフェクトしたCOS細胞由来の0.1mlまでの上清により、HC11-5T4細胞を96ウェルの組織培養トレイにおいて 10^4 細胞/ウェルで2時間インキュベートする。 10^5 までの予備刺激T細胞を各ウェルに添加し、細胞を0.25mCi/ウェルの ^3H -チミジンでパルスし、 ^3H -チミジンの組み込みを24時間後に液体シンチレーションカウンターを使用して測定する。

【0253】

実施例7—動物モデルにおける同時刺激の分析

ヒト5T4抗原遺伝子でトランスフェクトしたHC11細胞を、Balb/cマウスの腫瘍として成長させる。SCM遺伝子B7-1、5T4、1またはB7-2、5T4、1または両遺伝子の組み合わせを、移植前に腫瘍細胞に移入し、腫瘍の成長およびSCM遺伝子をインビボで発現しないコントロール腫瘍の成長をモニターする。

【0254】

実施例8—ヒト5T4に特異的な融合タンパク質B7-1/ScFvの構築

標準的な分子生物学技術を使用して、可変性リンカーを介してヒト5T4に特異的なマウスMa b 5T4の V_H および V_L に融合したB7-1のリーダー配列および細胞外ドメインからなる誘導タンパク質を構築する。

【0255】

B7.1の細胞外ドメインとScFvとの連結に使用した可変性リンカーを、以下のオリゴヌクレオチドを使用した操作5' Sma Iおよび3' Spe I部位での2つの相同なオリゴヌクレオチドのアニーリングによって構築した。

上流

【化2】

5' GGG GGT GGT GGG AGC GGT GGT GGC GGC AGT GGC GGC GGC GGA A
3'

および下流

【化3】

5' CTA GTT CCG CCG CCG CCA CTG CCG CCA CCA CCG CTC CCA CCA
CCC CC 3'

【0256】

Sma IおよびSpe Iを介してリンカーをpBluescript (Stratagene) にクローン化してpLINKを作製する。5' Eco RIおよび3' Sma I部位を移入する以下のプライマーを介したpLK444-mB7.1 (R. Germain NIH, USAから得た) 由来のPCRによってマウスB7.1のシグナルペプチド(sp) および細胞外ドメインを増幅させた。

正方向プライマー

【化4】

5' C TCG AAT TCC ACC ATG GCT TGC AAT TGT CAG TTG ATG C 3'

逆方向プライマー

【化5】

5' CTC CCC GGG CTT GCT ATC AGG AGG GTC TTC 3'

【0257】

EcoRIおよびSmaIを介してB7.1産物をpLINKにクローン化してpBS/B7Linkを形成させた。

【0258】

pHEN1-5T4 ScFv由来の5' SpeIおよび3' NotI部位を移入する以下のプライマーを介して5T4特異的ScFvのV_HおよびV_Lを増幅させた。

正方向プライマー

【化6】

5' CTC ACT AGT GAG GTC CAG CTT CAG CAG TC 3'

逆方向プライマー

【化7】

5' CTC GCG GCC GCT TAC CGT TTG ATT TCC AGC TTG GTG CCT CCA CC
3'

PBS/B7LinkをSpeIおよびNotIで消化して、ScFvとライゲートして配列番号11 (B7LinkScFv配列(図5))の配列からなるOBM233を形成させた。

【0259】

この融合を使用して組換えベクター(例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス)を構築することができる。このようなベクターを使用して、患者の腫瘍に直接注射することができる。腫瘍細胞に融合タンパク質を送達させるために、組換えベクターを使用して、マクロファージ/単球/CD34+細胞にエクスピドで形質導入し、注射によって患者に戻す。この細胞が腫瘍に輸送される。ScFvは、腫瘍細胞表面上に発現する特異的腫瘍抗原(例えば、5T4)に結合する(Myersら、1994、JBC)。B7はプロ抗原提示細胞(例えば、マクロファージ、樹状細胞、およびB細胞)の表面上に見出される。これは、CD4お

よびCD8細胞上に存在するリガンドCD28およびCTL-A4と相互作用する。B7-CD28/CTL-A4およびMHC-ペプチド/T細胞レセプターの刺激相互作用により、CD8（細胞傷害性T細胞）の増大を促進するIL-2が明白に増加する（Linsley PS、Brady W、Grosmaire L、Aruffo A、Damle NK、Ledbetter JA、J. Exp. Med.、1991、Mar 1、173（3）、721～730、「CD28へのB細胞活性化抗原B7の結合によりT細胞増殖およびIL-2 mRNA蓄積が同時刺激される」）。動物モデルにおいてB7でトランスフェクトされた腫瘍細胞は増殖遅滞を示している（Townsend SE、Allison JP Science、1993、15、259（5093）、368～370）。

【0260】

実施例9-B7-1/ScFvおよびリーダーScFv（LScFv）の一過性発現および精製

B7-1/ScFvの一過性発現のために、ヒトCMV発現プラスミドpCIneo（Promega）を使用した。B7/ScFvをEcoRI/NotIでの消化によってOBM233から切り出し、EcoRI/NotIで予め消化したpCIneoにクローン化した。リン酸カルシウム（Profectin、Promega）を使用して関連プラスミドを293T細胞にトランスフェクションすることで組換えタンパク質を一過性発現させた。使用条件は、製造者が指示した条件に類似する。ウシ血清の汚染を減少させるために、無血清最適培地（Gibco BRL）を使用した。トランスフェクションから36～48時間後、上清を回収し、Centriprep（Amicon、Glos. UK）10フィルター（10kDaを超える全てのタンパク質が精製/濃縮される）およびCentricon（Amicon）10フィルターでスピンの。上清を約30倍に濃縮する。

【0261】

B7-1を生物学的に機能的にするために、B7-1はT細胞の特定の集団（例えば、CD4+）の表面上に見出される天然のリガンドの1つ（CTLA-4

またはCD28のいずれか)との結合をディスプレイすることができなければならない。B7-1/ScFv融合タンパク質の生物活性を、その天然のリガンドCTLA-4 (An cell, MN, USAによって供給されているCTLA4-Igの形態) およびヒト5T4を発現するA9細胞との同時相互作用について分析した。簡単に述べれば、約 5×10^5 のA9-h5T4細胞を、U底96ウェルプレート中、4℃で1時間100 μ lのB7. 1/ScFvまたはLScFv上清のいずれかとインキュベートした。洗浄後、細胞をCTLA4-Ig (An cell) と1時間インキュベートした。洗浄後、結合したCTLA4-Igを、FITC抱合抗マウスIg (Dako) を使用して検出した。

【0262】

結果により、ヒト5T4陽性A9細胞表面へのScFvを介して結合したB7-1細胞外ドメインを有するCTLA-Igの結合が認められる。5T4陰性A9細胞の結合活性の欠乏により、B7のCTLA4-Igとの相互作用およびScFvの5T4との相互作用が特異的であることが示される。

【0263】

実施例10-ScFv-IgG融合タンパク質

ScFv-IgGの構築

翻訳開始配列およびヒト免疫グロブリン κ 軽鎖シグナルペプチドをコードする配列を、アニーリングした場合でも5'末端に内部XhoI部位を含み、さらにXbaI適合性5'突出およびPstI適合性3'突出を放出する以下の2つの相補性一本鎖オリゴヌクレオチドとして合成する:

【化8】

ctagactcgagCCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA
GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAG GTC CAG ctgca

および

【化9】

g CTG GAC CTC GGA GTG GAC ACC TGT AGC TGT TGC TAC CAA GAA
GAG GAT GAT ACA GCT CCA TCC CAT GGTGGctcgagt

【0264】

次いで、これをXba IおよびPst Iで制限消化したpBluescript II (Stratagene) にクローン化してpBSII/Leaderを作製する。

【0265】

産物の5'末端にPst I部位、3'末端にHind IIIを組み込んだ以下のオリゴヌクレオチドを使用して、PCRによって、5T4 ScFvをpHEN1から増幅する：

【化10】

GTC CAG CTG CAG CAG TCT GG

および

【化11】

CG TTT GAT TTC AAG CTT GGT GC

【0266】

次いで、これらの酵素で制限消化し、同一の酵素で制限消化したpBSII/Leaderに挿入し、pBSII/Leader/ScFvを作製する。

【0267】

5'末端にHind III部位、3'末端にXho I部位を組み込んだ以下のオリゴヌクレオチドを使用してクローン化した遺伝子からPCRによってHIG1定常部を増幅させる：

【化12】

gcgc AAG CTT gaa atc aaa cgg GCC TCC ACC AAG GGC CCA

および

gcgc ctcgag TCA TTT ACC CGG AGA CAG GG

【0268】

次いで、これらの酵素で制限消化し、同一の酵素で制限消化した pBSII/Leader/ScFv に挿入し、pBSII/Leader/ScFv/HG1 を作製する。この構築物の配列を、図4（配列番号10）に示す。

【0269】

この融合を使用して組換えベクター（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス）を構築することができる。このようなベクターを使用して、患者の腫瘍に直接注射することができる。腫瘍に融合タンパク質を送達させるために、組換えベクターを使用して、マクロファージ/単球/CD34+細胞にエキスピボで形質導入し、注射によって患者に戻す。この細胞が腫瘍に輸送される。ScFvは、腫瘍細胞表面上に発現する特異的腫瘍抗原（例えば、5T4）に結合する（Meyersら、1994、JBC）。結合したIgGは、集合的に抗体依存性細胞性細胞傷害として公知の機構の集合を介して特異的腫瘍破壊を促進する（Munnら、Can. Res.、1991、前出、Primusら、1993、Cancer Res.、前出）。

【0270】

実施例11-ScFv-IgE1（ヒトIgE1重鎖定常部）の構築

図7に示す配列（配列番号2）からなる5T4ScFv-ヒトIgE1重鎖定常部の類似の融合構築物を作製する。

【0271】

RTによるヒトB細胞RNA由来のcDNAおよび5'末端にHindIII部位、3'末端にXhoI部位を組み込んだ以下のオリゴヌクレオチドを使用したPCRによるヒトIgE1重鎖定常部の増幅によってこの融合構築物を作製する：

【0272】

【化14】

gcgc AAG CTT gaa atc aaa cgg GCC TCC ACA CAG AGC CCA

および

【化15】

gcgc ctcgag TCA TTT ACC GGG ATT TAC AGA

【0273】

次いで、これらの酵素で制限消化し、同一の酵素で制限消化したpBSII/Leader/ScFvに挿入し、pBSII/Leader/ScFv/HE1を作製する。

【0274】

上記のように、ScFv-IgE構築物を、癌の遺伝子治療用に組換えウイルスベクターに組み込むことができる（例えば、患者の組織に直接注射するか、誘導マクロファージ/単球/CD34+細胞をエクスピボで患者に形質導入する）。融合タンパク質が分泌されてScFvに特異的な抗原を有する腫瘍細胞に結合する。IgEの結合により、肥満細胞の活性化を介して強力なヒスタミン反応が促進されるはずである。寄生虫（例えば、蠕虫の幼虫）のIgE細胞傷害性破壊について報告されているように、これにより、強い炎症反応が起こり、腫瘍細胞が破壊される（Capron M 1988、「疾患における好酸球：レセプターおよび媒介物」「アレルギーおよび臨床免疫学の進歩」（Proc. 第13回国際アレルギーおよび臨床免疫学会議）Hogrefe & Huber Toronto, 6頁）。このような炎症および腫瘍の破壊により、他の免疫効果細胞の漸増が開始されるはずである。過去の報告では、MMTV抗原特異的IgE Mabでの処理により腫瘍発現MMTV抗原から保護されると示されている（Nagy E Istavan B, Sehon AH, 1991, Cancer Immunol., Immunotherapy, 第34巻, 63~69）。

【0275】

実施例 12-B7/EGF の構築

B7-EGF 合成遺伝子

成熟 EGF ペプチド (アクセッション番号 X04571 を参照のこと) をコードする遺伝子領域から増幅した PCR 産物の pBS/B7Link への挿入によって B7-EGF の融合構築物を作製する。この構築物は、図 8 に示す配列 (配列番号 13) を有する。

【0276】

細胞株 (293 ヒト腎臓株 (ATCC: CRL1573) など) から単離した RNA の RT によって作成した cDNA を使用し、N 末端に Spe I 制限酵素部位および C 末端に Not I 部位を含む以下のオリゴヌクレオチドを使用した PCR によって DNA を増幅する。

【化 16】

GG ACT AGT AAT AGT GAC TCT GAA TGT CCC

および

【化 17】

ATT AGC GGC CGC TTA GCG CAG TTC CCA CCA CTT C

【0277】

得られた産物を酵素で制限消化し、同一の酵素で制限消化した pBS/B7Link にライゲートし、pBS/B7Link-EGF を作製する。次いで、B7Link-EGF カセットを Eco RI および Not I で切り出し、LacZ 遺伝子を保有しない pHIT111 の誘導体 (Soneoka ら、1995、Nucleic Acid Res.、23、628) に挿入する。

【0278】

ScFv の代わりに、その対応するレセプターに対して高い親和性を有する成長因子 (例えば、腫瘍形成に非常に関連する erb-2 を含むいくつかのレセプターに結合する上皮成長因子) を使用する。

【0279】

上記のように、融合構築物を、癌の遺伝子治療用に組換えウイルスベクターに組み込むことができる（例えば、患者の組織に直接注射するか、誘導マクロファージ／単球／CD34＋細胞をエキスピボで患者に形質導入する）。融合タンパク質が分泌されてe r b－2抗原を有する腫瘍細胞に結合する。

【0280】

上皮成長因子（EGF）は、そのリガンドe r b－2（EGFレセプター）に結合するので、S c F vが不要になる。E r b－2は腫瘍細胞と非常に関連する（Hynes NE、Semin Cancer Biol.、1993、Feb、4（1）、19～26、「ヒト腫瘍におけるe r b B－2遺伝子の増幅および過剰発現：腫瘍成長との関連、予後因子として意義、および癌治療の標的としての可能性」）。B7はプロ抗原提示細胞（例えば、マクロファージ、樹状細胞、およびB細胞）の表面上に見出される。これは、CD4およびCD8細胞上に存在するリガンドCD28およびCTL－A4と相互作用する。B7－CD28／CTL－A4およびMHC－ペプチド／T細胞レセプターの刺激相互作用により、CD8（細胞傷害性T細胞）の増大を促進するIL－2が明白に増加する（Linsley PS、Brady W、Grosmaire L.、Aruffo A.、Damle NK、Ledbetter JA、J. Exp. Med.、1991、Mar 1、173（3）、721～730、「CD28へのB細胞活性化抗原B7の結合によりT細胞増殖およびIL－2 mRNA蓄積が同時刺激される」）。動物モデルにおいてB7でトランスフェクトされた腫瘍細胞は増殖遅滞を示している（Townsend SE、Allison JP Science、1993、15、259（5093）、368～370、「B7トランスフェクト黒色腫細胞によるCD28＋T細胞の直接同時刺激後の腫瘍拒絶」）。B7は腫瘍細胞に特異的な腫瘍抗原に対するCTL反応を向上させるので、全てのこのような細胞が破壊されると報告されている。

【0281】

実施例13－融合構築物を発現する細胞株の産生

染色体組み込み後LTRの転写調節下にあるように、S c F v－I g G遺伝子を、Xho I消化によってpBSII／L／S c F v／h I g G1から切り出し

、Xho I 部位を介して pLXSN にクローン化して pLXSN/ScFv-IgG を作製する。トリプルプラスミド HIT 系 (Landau & Littman, 1992, J. Virol, 66, 5110, Soneoka Y ら, 1995, NAR, 23, 628~633) を使用して MLV gap-pol 遺伝子 (pCIEGPPD) および VSV G エンベロープ (pRV67) を含む同時トランスフェクションプラスミドによってヒト腎臓細胞株 293T 中にウイルスを作製した。ウイルスを 48 時間後に回収し、これを使用して BHK021 細胞 (ATCC 番号 CCL-10) に形質導入する。形質導入から約 24 時間後、培養培地への 1mg/ml G418 (Gibco BRL) の添加により形質導入細胞を選択する。陽性コロニー由来の上清を回収し、Centriprep (Amicon, Glos. UK) 10 フィルター (10 kDa を超える全てのタンパク質が精製/濃縮される) および Centricon (Amicon) 10 フィルターでの遠心分離によって濃縮した。上清を約 30 倍に濃縮する。

【0282】

他の融合タンパク質を、類似のプロトコルを使用して Xho I 部位を介して pLXSN にクローン化し、発現し、濃縮する。

【0283】

特定のリガンドを発現する細胞との融合タンパク質の結合の FACS 分析

ScFv-IgG 融合タンパク質がその抗原 (ヒト 5T4) に特異的であるかどうかを同定するために、ヒト膀胱癌腫瘍株 (EJ) または h5T4 を発現する安定なマウス細胞、A9-h5T4 (Myers ら, 1994, JBC)、および 5T4 院生株 A9-neo の FACS 分析を行った。約 5×10^5 個の A9 または EJ 細胞を丸底 96 ウェルプレート (Falcon) 中で $100 \mu\text{l}$ の濃縮上清 (上記) の 1:5 希釈物と共に 4°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、結合したタンパク質を、抗ヒト IgG/FITC 抱合抗体 (Dako) を使用して検出する。Becton Dickinson FACS 装置で細胞を分析した。FACS の結果は、ScFv タンパク質のみからなるネガティブコントロール構築物と比較して ScFv-IgG 構築物で処理した 5T4 陽性細胞における蛍光活性は少なくとも 1 log 変化することを示す。A9neo の FACS は、

融合タンパク質のScFv成分の非特異的結合は存在しないを示す。

【0284】

抗ヒトIgE-FITC (Dako) を使用して融合タンパク質の結合を検出する以外は、上記と同様にScFv-IgGのFACS分析を行う。

【0285】

FACSおよびHC11-erb-2陽性細胞 (Hynesら、1990) を使用して、結合についてB7/EGF融合タンパク質を分析する。CTLA4-Ig (Ancell, USA) を使用して、結合した融合タンパク質のB7成分の生物活性を分析する。抗マウスIgG-FITCを使用して、CTLA-4結合を示す。

【0286】

融合タンパク質の分析

B7-scFvのFACS分析

下記のようにプラスミドpCIneo (Promega) 中でscFv (図13B) のc末端を (同定および精製させるために) 安定にトランスフェクトしたBHK-21細胞株からの発現によって組換えタンパク質を作製した。scFvが5T4抗原に結合することができることを証明するために、これらの細胞および偽トランスフェクト293T細胞由来の上清をh5T4を発現するマウスA9細胞 (h5T4/ネオマイシン耐性発現構築物での安定なトランスフェクタント) に添加した。FITC抱合 α Hisまたは α Myc抗体を使用した検出によって、A9-5T4細胞へのscFvの結合が確認されたが5T4陰性A9neo細胞では確認されず、これは融合構築物が標的抗原に結合することができることを示している (図14)。

【0287】

B7-scFvタンパク質がB7.1リガンド (CTLA4) およびh5T4を発現する細胞に同時に結合することができることを示すためにさらなるFACS分析を行い、A95T4およびA9neo細胞をscFvのみ、Myc-Hisタグを欠くB7-scFv構築物またはタグ化B7-scFv構築物とインキュベートした。B7.1リガンドCTLA4-Igを添加し、FITC抱合 α

マウスIgGを使用して検出した(図15)。Myc-Hisタグの有無による5T4抗原およびCTLA-4へのタンパク質の同時結合の差は無かった。

【0288】

5T4 scFv-HIgG1タンパク質の分析

CMV初期/最初期プロモーターの調節下での5T4 scFvのみまたは5T4 scFv-Hg1(それぞれ、図13AおよびC)融合物を含む構築物でのBHK-21の安定なトランスフェクションによって組換えタンパク質を作製した。図16はマウスA95T4細胞のFACS分析を示す。細胞を、scFvのみまたはscFv-Hg1のいずれかを発現するBHK-21細胞由来の細胞上清とインキュベートし、その後ヤギ抗IgG-FITC標識抗体とインキュベートした。認められるように、scFv-Hg1は5T4発現細胞に結合することができ、ヤギ抗ヒトIgG-FITC標識抗体で検出することができる。図16bは、ネオマイシン耐性マーカーを発現するA9細胞で結合が認められないがh5T4で認められるので、これは細胞表面での5T4の存在によることを示す。

【0289】

scFv-Hγ1融合タンパク質がA95T4細胞の溶解を指向することができることを証明する抗体依存的細胞媒介細胞傷害性(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)(ADCC)アッセイで同一の上清を使用した。A95T4およびneo細胞をクロム放出アッセイで使用した。⁵¹Crでの標識後、細胞を無タンパク質scFvのみまたはscFv-Hγ1融合構築物とインキュベートした。新たに単離した末梢血リンパ球を添加し、4時間インキュベートした。上清の1部をシンチレーションカウンティングのために取り出した。

溶解%を以下のように計算した。

【数1】

試験放出-自発的放出 × 100

最大放出-自発的放出

【0290】

s c F vのみと比較すると、エフェクター：標的比の増加によって約40%までが溶解した。5 T 4陰性細胞株では、溶解は増加しなかった（図17）。

【0291】

実施例14－動物モデルにおける効率の分析

十分に確立された技術（例えば、Strobelら、1997、Cancer Res.、57、1228～1232；McLeodら、1997、Pancreas、14、237～248を参照のこと）にしたがって、ヒト腫瘍由来の細胞株および組織を遺伝的に免疫不全の「ヌード」マウスにおいてインビボで培養する。同型腫瘍株を免疫能力マウス株に移入した同型マウスモデルを使用することもできる。これらのマウスを、本発明の遺伝子送達系の評価に適切な動物モデルとして使用する。ベクターおよび操作細胞を腫瘍に全身投与または直接投与し、処理および未処理動物における腫瘍成長をモニターする。この系を使用して、本発明の有効な治療投薬範囲および最も適切な投与経路を定義する。

【0292】

S c F v融合タンパク質のインビボ抗腫瘍有効性データ

本研究の目的は、一連の一本鎖抗体融合タンパク質の有効性を試験することである。

【0293】

CT26（BALB/c起源の化学的に誘導された腺癌）（Brittainら、1980、Cancer Res.、40、179～184）およびB16（C57B6マウス由来の黒色腫株）に基づくマウスモデル。CT26株およびB16は共に安定に形質転換されてヒトおよびマウス5T4を発現する。マウスをI. V. 注射（肺小結節を誘導するため、CT26）または皮下注射（CT26およびB16）して1つの皮下腫瘍の塊を作製する。

【0294】

実験デザイン

ヒト5T4（CT26-h5T4）およびCT26-neoを発現するCT26細胞

細胞を、PBS、LS c F v-1、LS c F v-2、B7-S c F v、S c F v-I gと予備インキュベートした。

【0295】

LS c F v-1および2をBHK細胞株中で発現させた。LS c F v-1をニッケルカラムでヒスチジンタグを介して精製し、S c F v-2を濾過システムを使用して精製した。B7-S c F vをHisタグを介してBHK株から精製し、S c F v-I gを濾過カラムを介して精製した。実験で利用した各S c F vの濃度を、FACSアッセイにおけるCT26-h5T4細胞の結合の飽和に必要なタンパク質の量として定義した。

【0296】

CT26-h5T4およびCT26-neo細胞を、飽和量の各S c F vと予備インキュベートし、1時間インキュベートした。洗浄後、 5×10^5 個の細胞を同系BALB/cマウスの脇腹に皮下注射した。

【0297】

2日毎に腫瘍を測定し、体積を計算した。

【0298】

結果14

図9：CT26-neo

LS c F v-1での処理以外の研究群の間に有意な差は認められず、腫瘍接種から36日後にPBSコントロールと比較して腫瘍サイズが約1/3に減少する。

【0299】

図10：CT26-h5T4

全ての5T4S c F v構築物で処理した腫瘍は、腫瘍成長に有意な効果を有した。5T4S c F v-1で処理した5匹のマウスのうち4匹は36日目に腫瘍が存在しなかった。S c F v-1処理腫瘍細胞は、36日目にPBSで処理した腫瘍よりも1/60未満であった。

【0300】

h5T4を発現するように操作したマウス黒色腫株(B16)を使用して類似

の実験を行った場合、使用したS c F v構築物では最小の抗腫瘍効果が認められた(図11および12を参照のこと)。CT26は、B16細胞よりもS c F v結合によって誘導された抗腫瘍免疫応答に対する感受性が高い。さらに、B16細胞はマウス5T4を発現しないのに対して、CT26細胞はマウス5T4のmRNAを有する。

【0301】

まとめると、CT26およびB16マウスモデルにおいて5T4特異的S c F vへのB7またはIgGの融合には有利ではないようである。実際、本発明者らは本実験で、S c F vのみはその結合親和性の高さによりS c F v融合構築物よりも有効であることを見出した(B7-S c F vと比較したBIACOREに示す)。したがって、これらのデータは、5T4モデルにおいてS c F vのみで腫瘍の妨害に有意な効果を示し、S c F vに融合した免疫増強分子は腫瘍妨害効果には必要ではないことを示す。

【0302】

実施例15-融合構築物を発現するレンチウイルスベクターの産生

pONY8.1SMでのB7-5T4 s c F vおよびL-5T4 s c F vクローニング

pONY8.1SM(図18)は、CMVプロモーターの下流に固有のクローニング部位を有するEIAVベクターである。これは、WO99/32646の図1に記載のベクター由来である。pONY8.1SMは、含まれるEIAV配列(約1.1kb)および発現するEIAVタンパク質(なし)に関して現在最も小さなEIAVベクターである。

【0303】

pONY8.1SMにB7-5T4 s c F vおよびLeader-5T4 s c F v(L-5T4 s c F v)をクローン化するために、下記のプライマーを使用して、遺伝子の5'末端でSbfI部位および終止コドンの後ろにEcoRI部位を組み込むためにpBluescriptIIに予めクローニングした構築物(実施例8および10を参照のこと)から配列を増幅する。次いで、構築物を同一の酵素で予め消化したpONY8.1SMに直接ライゲートする。

【0304】

B7-5T4scFv用のプライマーを以下に示す。
プライマー1. B7-Sbf
【化18】

ATCGCCTGCAGGCCACCAATGGCTTGCAATTGTCAG

SbfI部位＝下線
コザック配列＝太字の斜字体で示し、ATG開始コドンに下線を引いている。

【0305】

プライマー2. 5T4sc-R1
【化19】

GCGCGAATTCTTACCGTTTGATTTCAGCTTGGT

EcoRI部位＝下線
TAA終止コドン＝太字の斜字体

【0306】

次いで、得られた産物をpONY8.1SMにクローン化して図19aに記載の融合タンパク質構築物を作製する。

【0307】

L-5T4scFv用のプライマーを以下に示す。
プライマー1. L-Sbf
【化20】

ATCGCCTGCAGGCCACCAATGGGATGGAGCTGTAT

SbfI部位＝下線
コザック配列＝太字の斜字体で示し、ATG開始コドンに下線を引いている。

【0308】

プライマー2. 5T4sc-R1
【化21】

GCGCGAATTCTTACCGTTTGATTTCCAGCTTGGT

Eco RI 部位＝下線

TAA 終止コドン＝太字の斜字体

【0309】

次いで、得られた産物を pONY8.1SM にクローン化して図19b に記載の構築物を作製する。

【0310】

IL-5 に特異的な scFv の組み立ておよびクローニング

抗 IL-5 scFv をハイブリドーマ株 (IL-5 に対するヒト化 Mab を発現するハイブリドーマ株 SB240563 など) から調製した材料を使用した RT-PCR によって組み立てる (Leckie, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159, A624, 1999)。この技術は、Clackson らに記載の技術 (「遺伝子操作したモノクローナル抗体」、Br. J. Rheumatol., 1991, 30, Suppl., 2, 36~9) と類似している。簡単に述べれば、SB240563 細胞から全 RNA を調製する。oligo dT プライマーを使用した MMLV 逆転写を使用して第1の鎖の合成を行う。V_H および V_L 遺伝子特異的プライマーを使用した PCR (pKLink にクローニングするための制限酵素部位 (下記のものなど)、可変性リンカー配列 (Gly₄Ser)₃ を含む pBluescript II SK (pBSII) プラスミド (図20) を含む) によってテンプレート cDNA を増幅する。これにより、一本鎖抗体 cDNA が形成される (図19)。5T4 に対する scFv の構築に記載のもの (実施例10を参照のこと) と類似の翻訳開始をコードする二本鎖オリゴヌクレオチド、コザック配列、および分泌のためのヒト Igκ 軽鎖シグナルを、scFv の上流にクローン化する (図21)。

【0311】

次いで、完全な構築物を、SbfI および Eco RI で切り出し、pONY8.1SM にクローン化する (図22)。

【0312】

HIVのエンベロープタンパク質gp120に特異的なscFvの組み立ておよびクローニング

抗HIVscFvをHIVのエンベロープタンパク質gp120にmAbを発現するハイブリドーマ株(mAb110.3など)(Connellyら、Virology、295、554～557、1994)から調製した材料を使用したRT-PCRによって組み立てる。あるいは、誘導分泌を使用してヒト化抗体(Beiboer SHら、J. Mol. Biol.、2000、296、833～849を参照のこと)を作製し、それからscFvを誘導する。この技術は、Clacksonらに記載の技術(「遺伝子操作したモノクローナル抗体」、Br J Rheumatol.、1991、30、Suppl.、2、36～9)と類似している。簡単に述べれば、ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する。oligo dTプライマーを使用したMMLV逆転写を使用して第1の鎖の合成を行う。V_HおよびV_L遺伝子特異的プライマーを使用したPCR(pK Linkにクローニングするための制限酵素部位(下記のものなど)、可変性リンカー配列(Gly₄Ser)₃を含むpBluescript IISK(pBSII)プラスミド(図20)を含む)によってテンプレートcDNAを増幅する。これにより、一本鎖抗体cDNAが形成される(図21)。5T4に対するscFvの構築に記載のもの(実施例10を参照のこと)と類似の翻訳開始をコードする二本鎖オリゴヌクレオチド、コザック配列、および分泌のためのヒトIgκ軽鎖シグナルを、scFvの上流にクローン化する(図19)。

【0313】

次いで、完全な構築物を、SbfIおよびEcoRIで切り出し、pONY8.1SMにクローン化して(図18)、図23に示した構築物を作製する。

【0314】

実施例16—融合構築物を発現するアデノウイルスベクターの産生

5T4scFv融合構築物、IL-5scFv、およびHIVgp120scFvを発現する組換えアデノウイルスの産生

pAdAptへのB7-5T4scFvおよびL-5T4scFvクローニング

CMVの下流に8つの固有のクローニング部位を有するアデノウイルス導入ベクター (pAdApt、図24を参照のこと) は、Crucell、Leiden、Netherlandsから市販されている。

【0315】

pAdAptにB7-5T4scFvおよびLeader-5T4scFv (L-5T4scFv) をクローン化するために、pBluescript II に予めクローン化した構築物 (実施例8および10を参照のこと) から配列を切り出し、以下のベクターにライゲートする。

【0316】

B7-5T4scFv用: B7-scFvをXbaIで消化し、充填して平滑末端を作製し、EcoRIで消化する。次いで、この断片をHpaIおよびEcoRIで予め消化したpAdAptベクターにライゲートする (図25A)。

【0317】

L-5T4scFv用: L-5T4をXhoIで切断し、充填して平滑末端を作製し、HpaIで予め消化したpAdAptベクターにライゲートする。その後得られたクローンをL-5T4scFvインサートの正確な方向についてチェックする (図25B)。

【0318】

IL-5に特異的なscFvのpAdAptでのクローニング

pBSIIにクローン化したL-scFv (実施例13を参照のこと) を、XbaIで消化し、充填して平滑末端を作製し、EcoRIで消化する。pAdAptベクターをHindIIIで消化し、充填して平滑末端を作製し、EcoRIで消化する。2つの分子をライゲートして上記の図25Bと類似の組換え導入ベクターが得られる (EcoRI制限部位が融合構築物の3'末端 (HindIII部位の充填物に隣接する遺伝子の5'末端) に存在することを除く)。

【0319】

HIVのエンベロープタンパク質gp120に特異的なscFvのクローニン

グ

pBSIIにクローン化したL-scfv（実施例13を参照のこと）を、XbaIで消化し、充填して平滑末端を作製し、EcoRIで消化する。pAdAptベクターをHindIIIで消化し、充填して平滑末端を作製し、EcoRIで消化する。2つの分子をライゲートして上記の図25Bと類似の組換え導入ベクターが得られる（EcoRI制限部位が融合構築物の3'末端（HindIII部位の充填物に隣接する遺伝子の5'末端）に存在することを除く）。

【0320】

scfv融合構築物を発現する組換えアデノウイルスの産生

scfv融合構築物を発現する組換えアデノウイルスを作製するために、PerC6細胞を、融合構築物およびアデノウイルスゲノムベクター（Quantum Appligene、Harefield UKのAdEasy）を含む等モルの組換え導入ベクターでトランスフェクトする。次いで、組換えウイルスをCrucellプロトコルに記載のように回収する。

【0321】

要約

したがって、本発明は、疾患関連細胞表面マーカー（DAM）を認識することができる抗体を提供する。これらの抗体を、DAM関連疾患の診断および治療に使用することができる。

【0322】

明細書に記載の全ての刊行物は、本明細書中で参考として組み込まれる。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本発明に係る、記載されている方法および系の種々の修正形態および変形形態が当業者に明らかである。本発明を特定の好ましい実施形態と共に記載しているが、特許請求の範囲に記載の本発明がこのような実施形態に過度に制限されないと理解されるべきである。実際、分子生物学やその関連分野の当業者に明白な本発明の実施のために記載した様式の種々の修正形態は本発明の対象となることが意図される。

【図面の簡単な説明】

本発明は、以下の図を参照し、例示のみの目的で、以下により詳細に述べられる。

【図 1】

5 T 4 S c F v. 1 と呼ばれる 5 T 4 S c F v をコードする DNA 配列（配列番号 5）を示す図である。成熟分泌タンパク質の配列（配列番号 1）を示す。

【図 2】

B 7-1. 5 T 4. 1 融合タンパク質（配列番号 7）をコードする DNA 配列を示す図である。B 7-1. 5 T 4. 1 融合タンパク質の推定アミノ酸配列（配列番号 3）も示す。

【図 3 a】

B 7-1. 5 T 4. 1 構築物の線図である。

【図 3 b】

B 7-1. 5 T 4. 2 構築物の線図である。

【図 4】

B 7-2. 5 T 4. 1 融合タンパク質をコードする DNA 配列（配列番号 9）を示す図である。B 7-2. 5 T 4. 1 融合タンパク質の推定アミノ酸配列（配列番号 10）も示す。

【図 5】

B 7 l i n k S c F v 配列（配列番号 11）を示す図である。

【図 6】

I g-5 T 4 融合タンパク質をコードする DNA 配列（配列番号 8）を示す図である。I g-5 T 4 融合タンパク質の推定アミノ酸配列（配列番号 4）も示す。

【図 7】

S c F v-I g E 配列（配列番号 12）を示す図である。

【図 8】

B 7-E G F 配列（配列番号 13）を示す図である。

【図 9】

35 日間にわたる B a l b/c マウスの C T 26-n e o 腫瘍細胞増殖に対す

る S c F v A b の効果を示す図である。

【図 10】

35 日間にわたる B a l b / c マウスの C T 2 6 - h 5 T 4 腫瘍細胞増殖に対する S c F v A b の効果を示す図である。

【図 11】

35 日間にわたる B a l b / c マウスの B 1 6 - n e o 腫瘍細胞増殖に対する S c F v A b の効果を示す図である。

【図 12】

35 日間にわたる B a l b / c マウスの B 1 6 - h 5 T 4 腫瘍細胞増殖に対する S c F v A b の効果を示す図である。

【図 13】

S c F v 構築物を示す図である。

【図 14】

5 T 4 標的抗原に結合する B 7 - s c F v を示す図である。

偽トランスフェクト 2 9 3 T 細胞またはタグ付きの B 7 - s c F v 構築物でトランスフェクトした細胞由来の上清を A 9 5 T 4 および A 9 n e o 細胞とインキュベートした。検出には、F I T C 抱合 α H i s または α M y c 抗体を使用した。

【図 15】

C T L A 4 に結合する B 7 - s c F v を示す図である。

s c F v のみ、M y c - H i s タグを欠く B 7 - s c F v 構築物またはタグ付きの B 7 - s c F v 構築物とインキュベートした A 9 5 T 4 および A 9 n e o 細胞を示す。B 7 . 1 リガンド、C T L A 4 - I g を添加し、検出には F I T C 抱合 α マウス I g G を使用した。

【図 16】

s c F v タンパク質のみまたは s c F v - H G 1 融合タンパク質の抗ヤギ抗ヒト I g G - F I T C 標識抗体とインキュベートした A 9 - 5 T 4 細胞 (A) および A 9 - n e o (5 T 4 ネガティブ) 細胞 (B) の F A C S 分析を示す図である。

【図17】

5T4scFv-Hγ1 ADCC活性を示す図である。

【図18】

pONY8.1SMを示す図である。

【図19】

pONY8.1SM中の融合タンパク質構築物を示す図である。a. B7-5T4scFv、b. L-5T4scFv

【図20】

pKLinkを示す図である。

pBluescript IISK (pBSII) 中のpKLink-(Gly₄Ser)₃リンカーを示す。2つの相補オリゴヌクレオチドとして可変性リンカーを合成し、これはアニーリングして制限酵素のための突出を獲得し、pBSIIに二本鎖オリゴヌクレオチドとしてクローン化したものである。(グリシン₄セリン)₃のアミノ酸翻訳をDNA配列の下に一字表記で示す。

【図21】

pBSII中のscFvおよびリーダー配列を示す図である。

PBSII中のscFv (例えば、IL-5またはHIV gp120 scFv) およびその後のリーダー配列を示す。この例では、VHを5'末端ではさらなるSpeIおよびMfeI制限部位で、3'末端ではさらなるAgeI部位で増幅する。SpeIおよびAgeI部位を使用してpKLinkにクローン化する。VLを5'末端ではさらなるBamHIで、3'末端ではさらなるEcoRI部位で増幅し、pKLinkでのクローニングに使用する。2つの相補オリゴヌクレオチドとしてリーダーシグナルペプチドを合成し、これはアニーリングして制限酵素のための突出を獲得し、その後scFv cDNAの5'末端でSpeI部位とMfeI部位との間に二本鎖オリゴヌクレオチドとしてクローン化したものである。ATG開始コドン (下線) を含むコザック配列を太字および斜体で示す。

【図22】

pONY8.1SM中のリーダー-IL-5scFvを示す図である。

【図23】

pONY8.1 SM中のリーダーHIV-gp120scFvを示す図である。

【図24】

pAdAptを示す図である。

【図25】

pAdApt中の融合タンパク質構築物を示す図である。a. B7-5T4scFv、b. L-5T4scFv

【図26】

イヌ5T4コード配列を示す図である。

イヌ5T4コード配列を示す。λダッシュ有の雑種ゲノムライブラリーをh5T4 cDNAから作製したプローブを用いてスクリーニングした。ポジティブクローンを同定および配列決定した。

FIG. 1

```

1   GAGGTCCAGC TTCAGCAGTC TGGACCTGAC CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC
    E V Q L Q Q S G P D L V K P G A S

51  AGTGAAGATA TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CTCATTCACT GGCTACTACA
    V K I S C K A S G Y S F T G Y Y

101 TGCACTGGGT GAAGCAGAGC CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGACGT
    M H W V K Q S H G K S L E W I G R

151 ATTAATCCTA ACAATGGTGT TACTCTCTAC AACCAGAAAT TCAAGGACAA
    I N P N N G V T L Y N Q K F K D K

201 GGCCATATTA ACTGTAGACA AGTCATCCAC CACAGCCTAC ATGGAGCTCC
    A I L T V D K S S T T A Y M E L

251 GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCGGTCT ATTACTGTGC AAGATCTACT
    R S L T S E D S A V Y Y C A R S T

301 ATGATTACGA ACTATGTTAT GGACTACTGG GGTCAAGTAA CCTCAGTCAC
    M I T N Y V M D Y W G Q V T S V T

351 CGTCTCCTCA GGTGGTGGTG GGAGCGGTGG TGCGCGCACT GGCGGCGGCG
    V S S G G G G S G G G G T G G G

401 GATCTAGTAT TGTGATGACC CAGACTCCCA CATTCTGCT TGTTCAGCA
    G S S I V M T Q T P T F L L V S A

451 GGAGACAGGG TTACCATAAC CTGCAAGGCC AGTCAGAGTG TGAGTAATGA
    G D R V T I T C K A S Q S V S N D

501 TGTAGDITGG TACCAACAGA AGCCAGGGCA GTCTCCTACA CTGCTCATAT
    V A W Y Q Q K P G Q S P T L L I

551 CCTATACATC CAGTCGCTAC GCTGGAGTCC CTGATCGCTT CATTGGCAGT
    S Y T S S R Y A G V P D R F I G S

601 GGATATGGGA CGGATTTCAC TTTCACCATC AGCACTTTGC AGGCTGAAGA
    G Y G T D F T F T I S T L Q A E D

651 CCTGGCAGTT TATTTCTGTC AGCAAGATTA TAATTCTCCT CCGACGTTCTG
    L A V Y F C Q Q D Y N S P P T F

701 GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAACGG
    G G G T K L E I K R

```

FIG. 2

ATGGGCCACA CACGGAGGCA GGAACATCA CCATCCAAGT GTCCATACCT	50
M G H T R R Q G T S P S K C P Y L	
CAATTTCTTT CAGCTCTTGG TGCTGGCTGG TCTTTCTCAC TTCTGTTCAG	100
N F F Q L L V L A G L S H F C S	
GTGTTATCCA CGTGACCAAG GAAGTGAAAG AAGTGGAAC GCTGTCCTGT	150
G V I H V T K E V K E V A T L S C	
GGTCACAATG TTTCTGTTGA AGAGCTGGCA CAAACTCGCA TCTACTGGCA	200
G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q	
AAAGGAGAAG AAAATGGTGC TGAATATGAT GTCTGGGGAC ATGAATATAT	250
K E K K M V L T M M S G D M N I	
GGCCCGAGTA CAAGAACCGG ACCATCTTTG ATATCACTAA TAACCTCTCC	300
W P E Y K N R T I F D I T N N L S	
ATTGTGATCC TGGCTCTGCG CCCATCTGAC GAGGGCACAT ACGAGTGTGT	350
I V I L A L R P S D E G T Y E C V	
TGTTCTGAAG TATGAAAAAG ACGCTTTCAA GCGGGAACAC CTGGCTGAAG	400
V L K Y E K D A F K R E H L A E	
TGACGTTATC AGTCAAAGCT GACTTCCCTA CACCTAGTAT ATCTGACTTT	450
V T L S V K A D F P T P S I S D F	
GAAATTCCAA CTTCTAATAT TAGAAGGATA ATTTGCTCAA CCTCTGGAGG	500
E I P T S N I R R I I C S T S G G	
TTTTCCAGAG CCTCACCTCT CCTGGTTGGA AAATGGAGAA GAATTAAATG	550
F P E P H L S W L E N G E E L N	
CCATCAACAC AACAGTTTCC CAAGATCCTG AACTGAGCT CTATGCTGTT	600
A I N T T V S Q D P E T E L Y A V	
AGCAGCAAAC TGGATTTCAA TATGACAACC AACCACAGCT TCATGTGTCT	650
S S K L D F N M T T N H S F M C L	
CATCAAGTAT GGACATTTAA GAGTGAATCA GACCTTCAAC TGGAATACAA	700
I K Y G H L R V N Q T F N W N T	
CCAAGCAAGA GCATTTTCCT GATGGAGGCG GGGGATCCGA GGTCCAGCTT	750
T K Q E H F P D G G G G S E V Q L	

CAGCAGTCTG GACCTGACCT GGTGAAGCCT GGGGCTTCAG TGAAGATATC	800
Q Q S G P D L V K P G A S V K I S	
CTGCAAGGCT TCTGGTTACT CATTCACTGG CTA CTACATG CACTGGGTGA	850
C K A S G Y S F T G Y Y M H W V	
AGCAGAGCCA TGGAAAGAGC CTTGAGTGGA TTGGACGTAT TAATCCTAAC	900
K Q S H G K S L E W I G R I N P N	
AATGGTGTTA CTCTCTACAA CCAGAAATTC AAGGACAAGG CCATATTAAC	950
N G V T L Y N Q K F K D K A I L T	
TGTAGACAAG TCATCCACCA CAGCCTACAT GGAGCTCCGC AGCCTGACAT	1000
V D K S S T T A Y M E L R S L T	
CTGAGGACTC TGCGGTCTAT TACTGTGCAA GATCTACTAT GATTACGAAC	1050
S E D S A V Y Y C A R S T M I T N	
TATGTTATGG ACTACTGGGG TCAAGTAACC TCAGTCACCG TCTCCTCAGG	1100
Y V M D Y W G Q V T S V T V S S G	
TGGTGGTGGG AGCGGTGGTG GCGGCACTGG CGGCGGCGGA TCTAGTATTG	1150
G G G S G G G G T G G G G S S I	
TGATGACCCA GACTCCCACA TTCCTGCTTG TTTCAGCAGG AGACAGGGTT	1200
V M T Q T P T F L L V S A G D R V	
ACCATAACCT GCAAGGCCAG TCAGAGTGTG AGTAATGATG TAGCTTG GTA	1250
T I T C K A S Q S V S N D V A W Y	
CCAACAGAAG CCAGGGCAGT CTCCTACACT GCTCATATCC TATACATCCA	1300
Q Q K P G Q S P T L L I S Y T S	
GTCGCTACGC TGGAGTCCCT GATCGCTTCA TTGGCAGTGG ATATGGGACG	1350
S R Y A G V P D R F I G S G Y G T	
GATTTCACTT TCACCATCAG CACTTTGCAG GCTGAAGACC TGGCAGTTTA	1400
D F T F T I S T L Q A E D L A V Y	
TTTCTGTCAG CAAGATTATA ATTCTCCTCC GACGTTGCGT GGAGGCACCA	1450
F C Q Q D Y N S P P T F G G G T	
AGCTGGAAAT CAAATAA	
K L E I K .	

FIG. 2_{CONT'D}

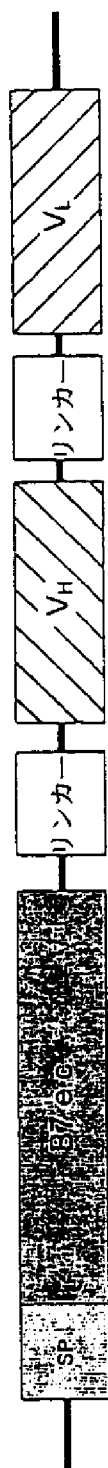


FIG. 3a



FIG. 3b

```

1   ATGGGACTGA GTAACATTCT CTTTGTGATG GCCTTCCTGC TCTCTGGTGC
    M G L S N I L F V M A F L L S G A

51  TGCTCCTCTG AAGATTCAAG CTTATTTCAA TGAGACTGCA GACCTGCCAT
    A P L K I Q A Y F N E T A D L P

101 GCCAATTTGC AAACCTCTCAA AACCAAAGCC TGAGTGAGCT AGTAGTATTT
    C Q F A N S Q N Q S L S E L V V F

151 TGGCAGGACC AGGAAACTT GGTTCCTGAAT GAGGTATACT TAGGCAAAGA
    W Q D Q E N L V L N E V Y L G K E

201 GAAATTTGAC AGTGTTCATT CCAAGTATAT GGGCCGCACA AGTTTTGATT
    K F D S V H S K Y M G R T S F D

251 CGGACAGTTG GACCCTGAGA CTTCACAATC TTCAGATCAA GGACAAGGGC
    S D S W T L R L H N L Q I K D K G

301 TTGTATCAAT GTATCATCCA TCACAAAAAG CCCACAGGAA TGATTCGCAT
    L Y Q C I I H H K K P T G M I R I

351 CCACCAGATG AATTCTGAAC TGTCAGTGCT TGCTAACTTC AGTCAACCTG
    H Q M N S E L S V L A N F S Q P

401 AAATAGTACC AATTTCTAAT ATAACAGAAA ATGTGTACAT AAATTTGACC
    E I V P I S N I T E N V Y I N L T

451 TGCTCATCTA TACACGGTTA CCCAGAACCT AAGAAGATGA GTGTTTTGCT
    C S S I H G Y P E P K K M S V L L

501 AAGAACCAAG AATTCAACTA TCGAGTATGA TGGTATTATG CAGAAATCTC
    R T K N S T I E Y D G I M Q K S

551 AAGATAATGT CACAGAACTG TACGACGTTT CCATCAGCTT GTCTGTTTCA
    Q D N V T E L Y D V S I S L S V S

601 TTCCCTGATG TTACGAGCAA TATGACCATC TTCTGTATTC TGGAAACTGA
    F P D V T S N M T I F C I L E T D

651 CAAGACGCGG CTTTATCTT CACCTTTCTC TATAGAGCTT GAGGACCCTC
    K T R L L S S P F S I E L E D P

701 AGCCTCCCCC AGACCACATT CCTGGAGGCG GGGGATCC
    Q P P P D H I P G G G G S

```

FIG. 4

FIG. 5

```

atggettgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg 60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa 120
caactgtcca agtcagttaa agataaggta ttgctgcctt gccgttacaa ctctccgcat 180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggg gctgtctgtc 240
attgctggga aactaaaagt gtggcccag tataagaacc ggactttata tgacaacact 300
acctactctc ttatcatcct gggcctggtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360
gttcaaaaaga aggaaagagg aacgtaigaa gttaaacact tggctttagt aaagtgtgcc 420
atcaaagctg acttctctac cccaacata actgagctctg gaaacccatc tgcagacact 480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctgcttctc ttggttgaa 540
aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600
tacaccatta gtagccaaact agatttcaat acgactcgca accacacat taagtgtctc 660
attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc ccagaagac 720
cctcctgata gcaagcccgg ggggtggggg agcgggtggtg gccgcagtgg cggcggcgga 780
actagttagg tccagcttca gcagtctgga cctgacctgg tgaagcctgg ggcttcagtg 840
aagatatcct gcaaggcttc tggttactca ttcactggct actacatgca ctgggtgaag 900
cagagccatg gaaagagcct tgagtggatt ggacgtatta atcctaacaa tgggtgtact 960
ctctacaacc agaaattcaa ggacaaggcc atattaactg tagacaagtc atccaccaca 1020
gcctacatgg agctccgag cctgacatct gaggactctg cgtctatta ctgtgcaaga 1080
tctactatga ttacgaacta tgttatggac tactggggtc aagtaacttc agtcaccgtc 1140
tcttcagggtg gtggtgggag cgtggtggc ggcactggcg gccgcggatc tagtattgtg 1200
atgaccacaga ctcccacatt cctgcttgtt tcagcaggag acagggttac cataacctgc 1260
aaggccagtc agagtgtgag taatgatgta gcttggtacc aacagaagcc agggcagctc 1320
cctacactgc tcatatccta tacatccagt cgtacgctg gatlccctga tcgcttcatt 1380
ggcagtggtat atgggacgga ttacacttcc accatcagca ctttgaggc tgaagacctg 1440
gcagtttatt tctgtcagca agattataat tctcctccga cgttcggtgg aggcaccaag 1500
ctggaaatca aacggtaa 1518

```

FIG. 6

リーダー／5T4scFv/HlgG DNAおよび推定タンパク質配列

CTCGAGCCACCATTGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAGGTCCAGCTG
H G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L

CAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGG
Q Q S G P D L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T

CTACTACATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGSAAGAGCCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTTA
G Y Y M H W V K Q S H G K S L E W I G R I N P N N G V

CTCTCTACCAACAGAAATTCAGGACAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCATCCACCACAGCCTACATGGAGCTCCGC
T L Y N Q K F K D K A I L T V D K S S T T A Y M E L R

AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCTACTATGATTACGAACATGTTATGGACTACTGGG
S L T S E D S A V Y Y C A R S T M I T N Y V M D Y W

TCAAGTAACTTCAGTCACCGTCTCTTCAGGTGGTGGTGGGAGCGGTGGTGGCGGCACTGGCGGCGGCGGATCTAGTATTG
G Q V T S V T V S S G G G G S G G G G T G G G G S S I

TGATGACCCAGACTCCACATTCTGCTTGTTCAGCAGGAGACAGGGTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTG
V M T Q T P T F L L V S A G D R V T I T C X A S Q S V

AGTAATGATGAGCTTGGTACCAACAGAGCCAGGGCAGTCTCCTACAGTGTCTATCTATACATCCAGTCCGTACGGC
S N D V A W Y Q Q K P G Q S P T L L I S Y T S S R Y

TGGAGTCCCTGATCGCTTCATTGGCAGTGGATATGGGACGGATTCACCTTCACCATCAGCAGCTTTGCAGGCTGAAGACC
A G V P D R F I G S G Y G T D F T F T I S T L Q A E D

TGGCAGTTTATTTCTGTGAGCAAGATTATAATTCCTCCGACGTTGGTGGAGGACCAAGCTTGAATCAAAACGGGGC
L A V Y F C Q Q D Y N S P P T F G G G T K L E I K R A

TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C

GGTCAAGGACTACTTCCCCAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCCCG
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P

CTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y

ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H

ATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCACCACCAAGGACACCCCTCA
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L

TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
M I S R T P E V T C V V V D V S H E O P E V K F N W Y

GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGGTGGT
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

CCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGGCCCCCA
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P

TCCAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG
I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E H

ACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCG
G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T

TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAG
V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q

AAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGACTCGAG
K S L S L S P G K .

FIG. 7

```

ctcgagccac catgggatgg agctgtatca tctcttctt ggtagcaaca gctacaggtg 60
tccactccga ggtccagctg cagcagctcg gacctgacct ggtgaagcct ggggcttcag 120
tgaagatata ctgcaaggct tctgggttact ctttacttgg ctactacatg cactgggtga 180
agcagagcca tggaaagagc cttgagtgga ttggacgtat taactctaac aatggtgtta 240
ctctctacaa ccagaaattc aaggacaagg ccatattaac tgtagacaag tcatccacca 300
cagcctacat ggagctccgc agcctgacat ctgaggactc tgcgggtctat tactgtgcaa 360
gatctactat gattacgaac tatgttatgg actactgggg tcaagtaact tcagtcacgg 420
tctcttcagg tgggtggggg agcgggtggg gcggcactgg cggcggcgga tctagtattg 480
tgatgaacca gactcccaaa ttctgtcttg ttccagcagg agacaggggt accataacct 540
gcaaggccag tcagagtgtg agtaatgatg tagcttggtt ccaacagaag ccagggcagt 600
ctcctacact gctcatatcc tatacatcca gtgcctacgc tggagtccct gatcgcttca 660
ttggcagtgg atatgggagc gatttcactt tcaccatcag cactttgcag gctgaagacc 720
tggcagttta tttctgtcag caagattata attctcctcc gacgttcggg ggaggcacca 780
agcttgaaat caaacggggc tccacacaga gccatccgtt ctcccccttg acccgctgct 840
gcaaaaaaat tccctccaat gccacctccg tgactctggg ctgctggggc acgggctact 900
tcccgagacc ggtgatgggt acctgggaca caggctccct caacgggaca actatgacct 960
taccagccac caccctcacc ctctctgtgc actatgccac catcagcttg ctgaccgtct 1020
cgggtgcgtg gqccaagcag atgttcacct gccgtgtggc acacactcca tgcgtccacag 1080
actgggtcga caacaaaacc ttcagcgtct gctccaggga ctccacccc cccaccgtga 1140
agatcttaca gtcgtcctgc gacggcgggc ggcacttccc ccgaccatc cagctcctgt 1200
gcctcgtctc tgggtacacc ccagggaact tcaacatcac ctggctggag gacgggcagg 1260
tcatggacgt ggacttgctc accgcctcta ccacgcagga gggtagctg gcctccacac 1320
aaagcgagct caccctcagg cagaagcact ggctgtcaga ccgcacctac acctccagg 1380
tcacctatca aggtcacacc tttagggaca gcaccaagaa gtgtgcagat tccaaccga 1440
gaggggtgag cgcctacctc agccggccca gccctgttga cctgttcatc cgcaagtgc 1500
ccacgatcac ctgtctgggt gtggacctgg caccacgcaa ggggaccgtg aaactgacct 1560
ggtccccggc cagtgggaag cctgtgaacc actccaccag aaaggaggag aagcagcgca 1620
atggcacgtt aaccgtcacg tccacctgc cgggtgggac ccgagactgg atcgagggg 1680
agacctacca gtgcagggtg acccaccccc acctgccag ggcctcatg cgggtccacga 1740
ccaagaccag cggcccgctg gctgccccgg aagtctatgc gtttggaag ccggagtggc 1800
cggggagccg ggacaagcgc accctcgctt gctgatcca gaactcatg cctgaggaca 1860
tctcgtgca gtggctgcac aacgaggtgc agctcccgga cggcgggac agcacgacgc 1920
agccccgcaa gaccaagggc tccggcttct tctgttccag ccgcctggag gtgaccaggg 1980
ccgaatggga gcagaagat gagttcatct gccgtgcagt ccatgaggca gcgagccct 2040
cacagaccgt ccagcgagcg gtgtctgtaa atcccgtaa atgagagctc 2090

```

FIG. 8

```

atggcttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg 60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa 120
caactgtcca agtcagtga agataaggta ttgctgcctt gccgttacaa ctctccgcat 180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaaagtgg gctgtctgtc 240
attgctggga aactaaaagt gtggcccgag tataagaacc ggactttata tgacaacact 300
acctactctc ttatcactct gggcctgggt ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360
gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaacact tggctttagt aaagtgttc 420
atcaaaagct acttctctac ccccaacata actgagtcgt gaaacccatc tgcagacact 480
aaaaggatta cctgctttgc ttcgggggtt ttccaaaagc ctgccttctc ttggttgga 540
aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacacat taagtgtctc 660
attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc ccagaagac 720
cctcctgata gcaagcccg ggggtggggg agcgggtggg gcggcagtg cggcggcgga 780
actagtaata gtgactctga atgtccctg tcccacgat ggtactgct ccatgatggt 840
gtgtgcattg atattgaagc attggacaag tatgcattga actgtgtgtt tggctacatc 900
ggggagcgat gtcagtaccg agacctgaag tgggtgggaa tgcgc 945

```

FIG. 9
CT26-neoトランスフェクタント

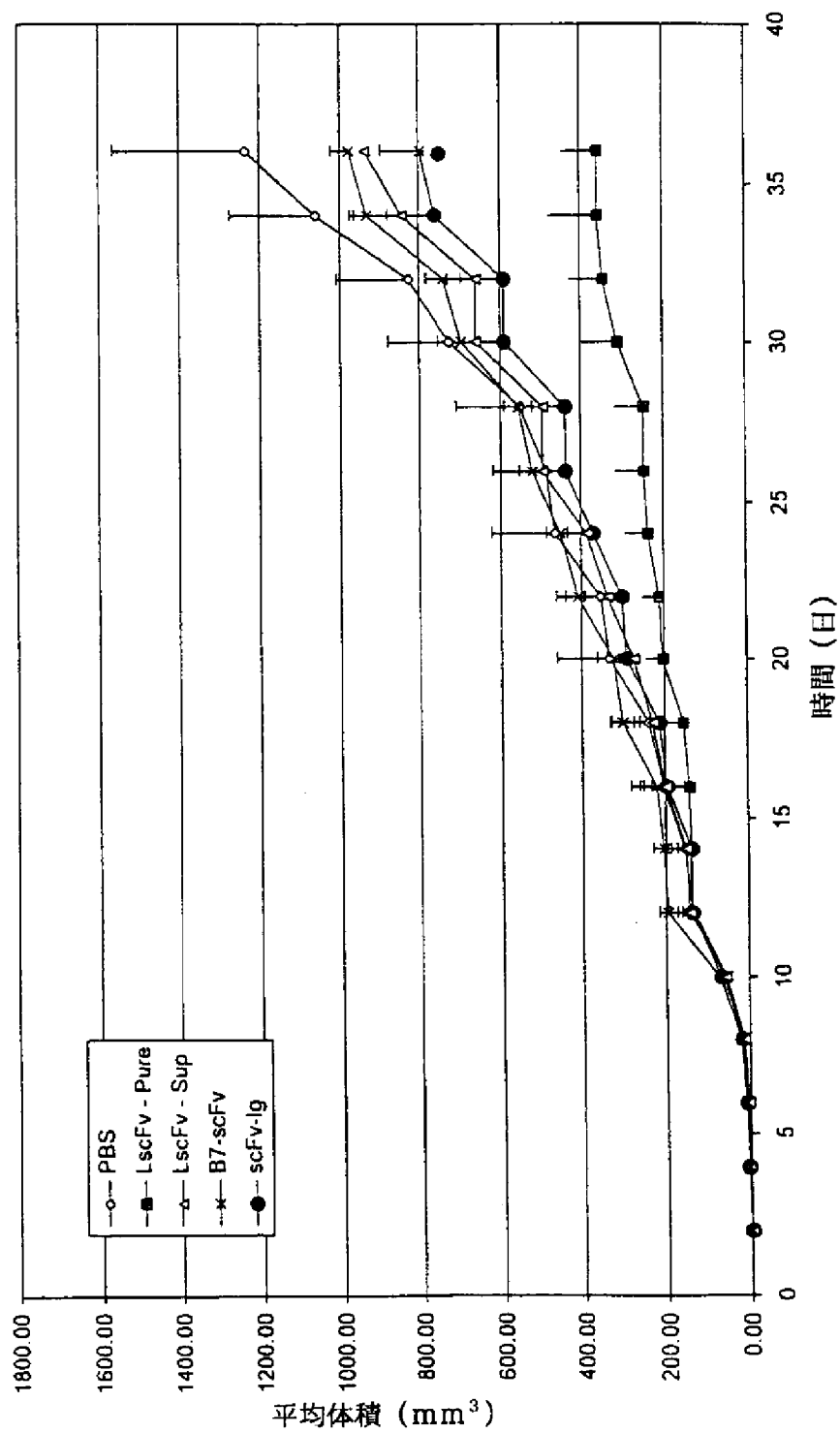


FIG. 10
CT26-h5T4トランスフェクタント

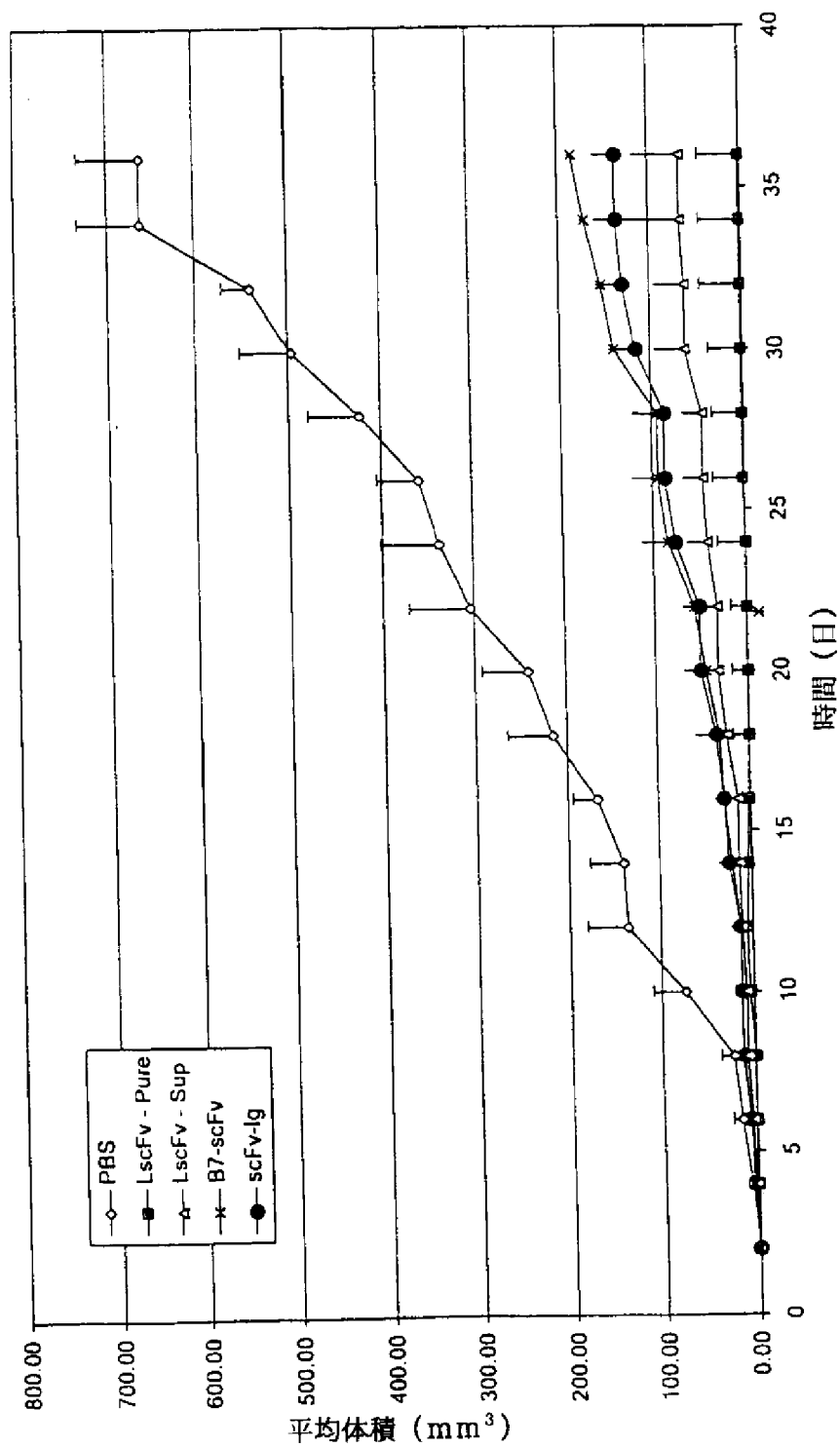


FIG. 11
B16-h5T4腫瘍成長

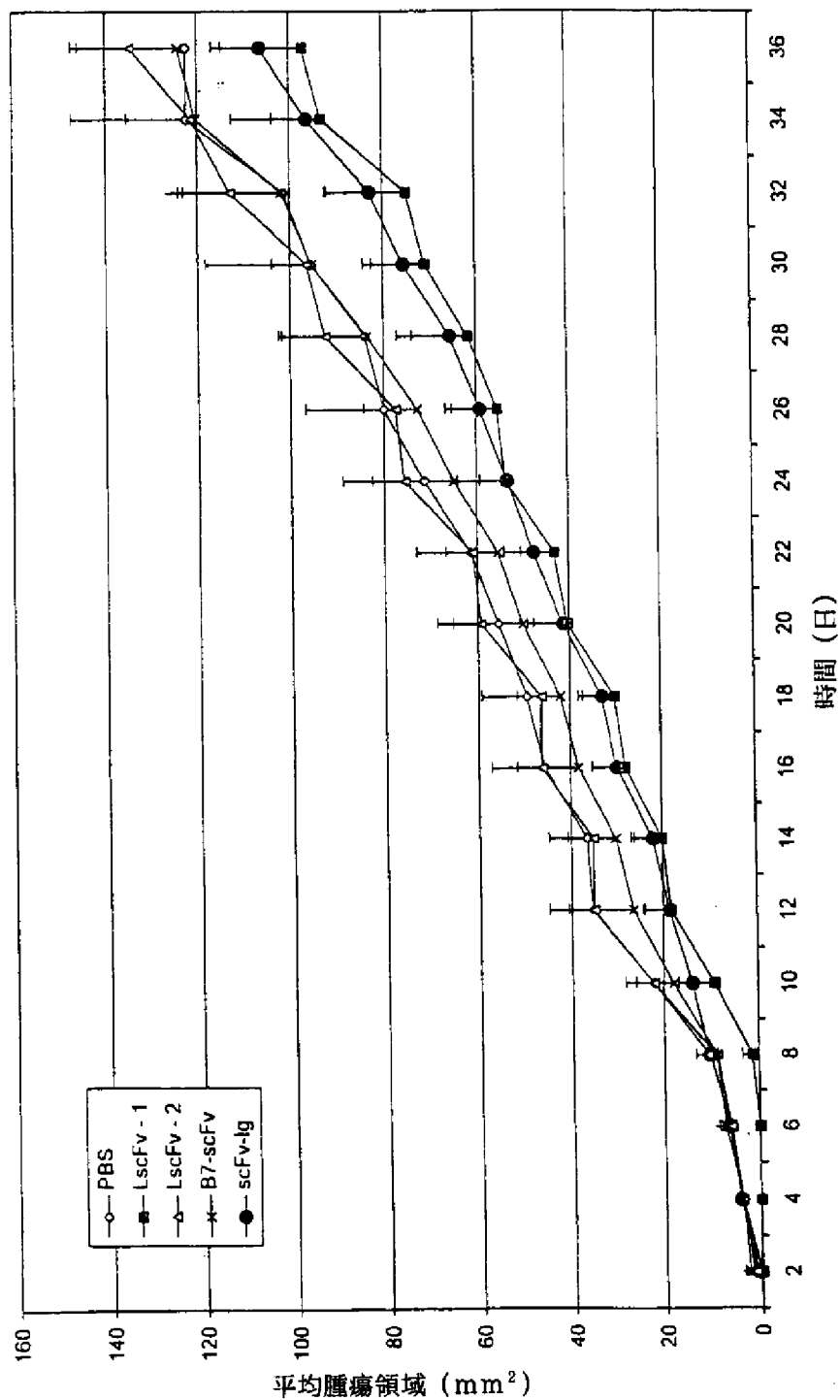
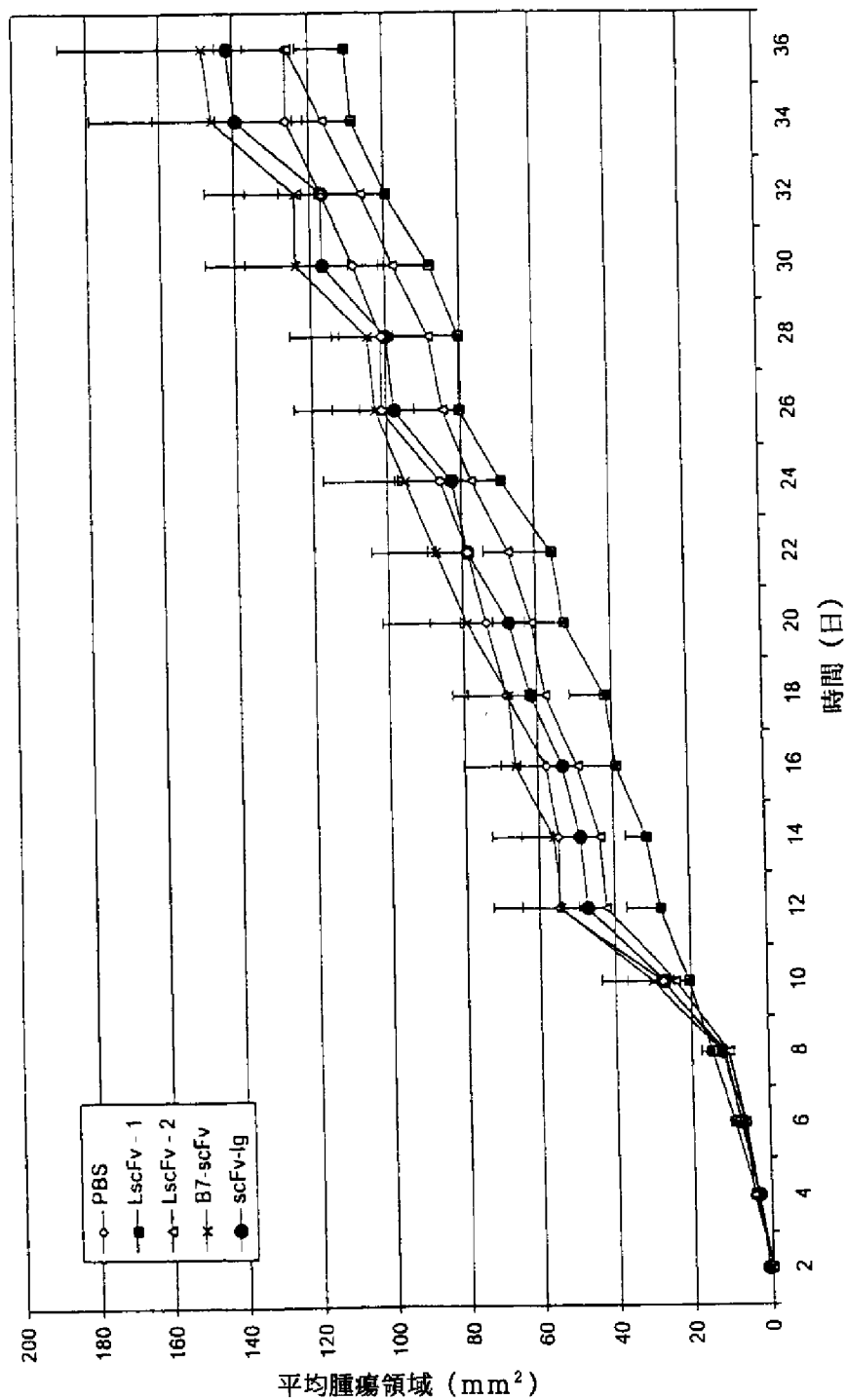


FIG. 12
B16-neo腫瘍成長



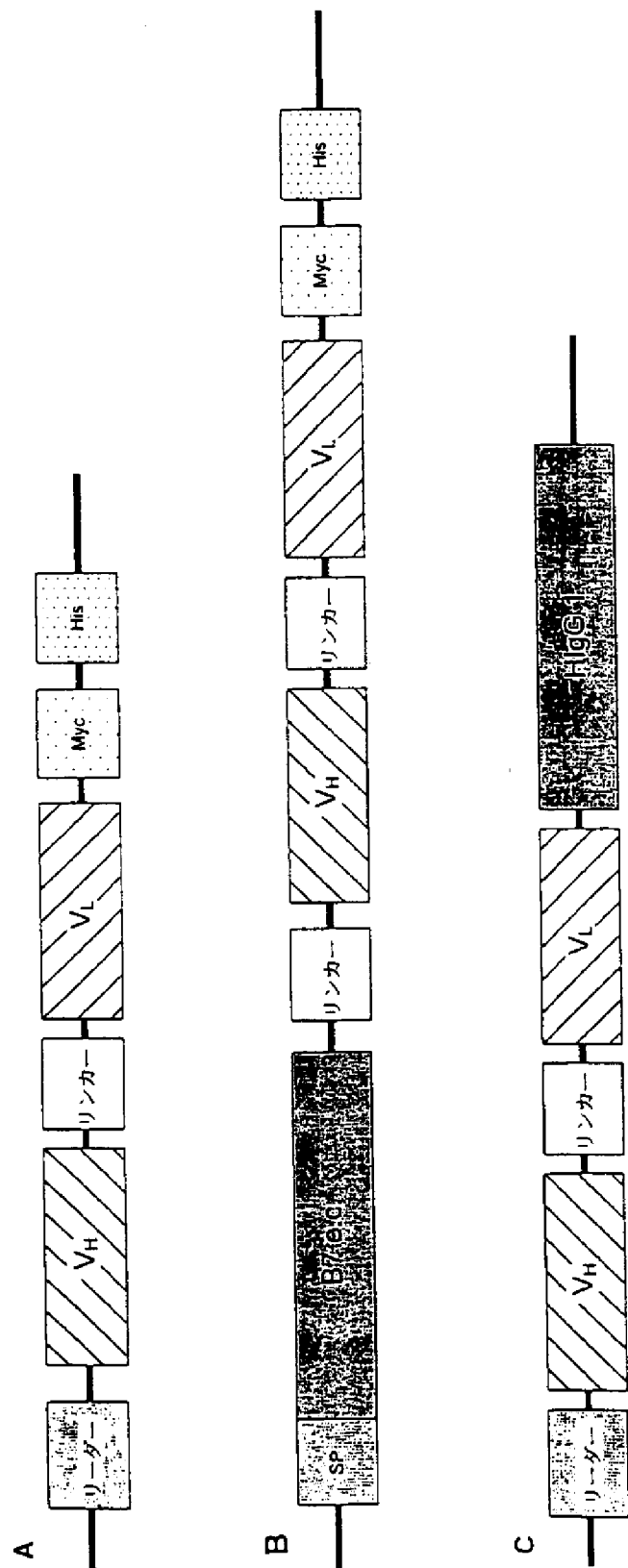


FIG. 13

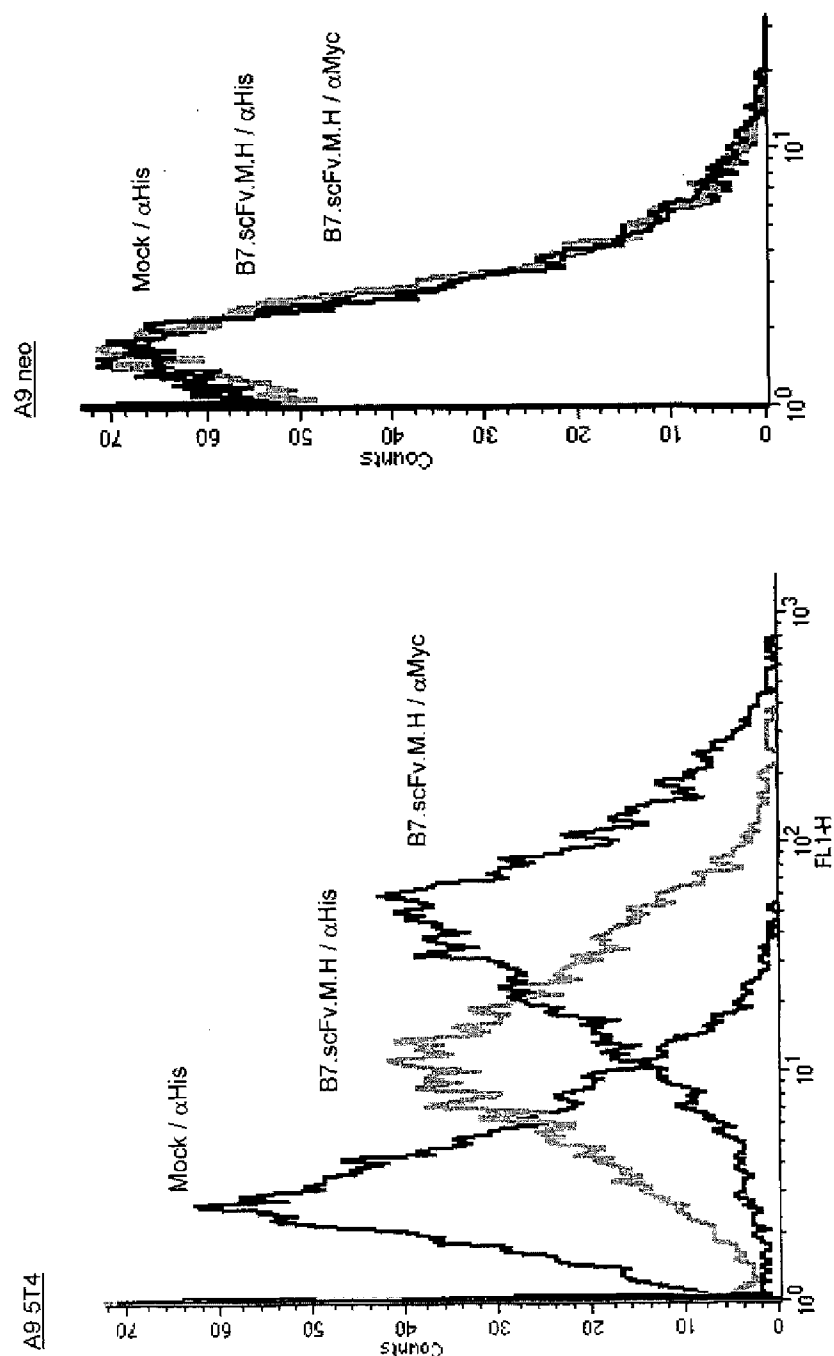
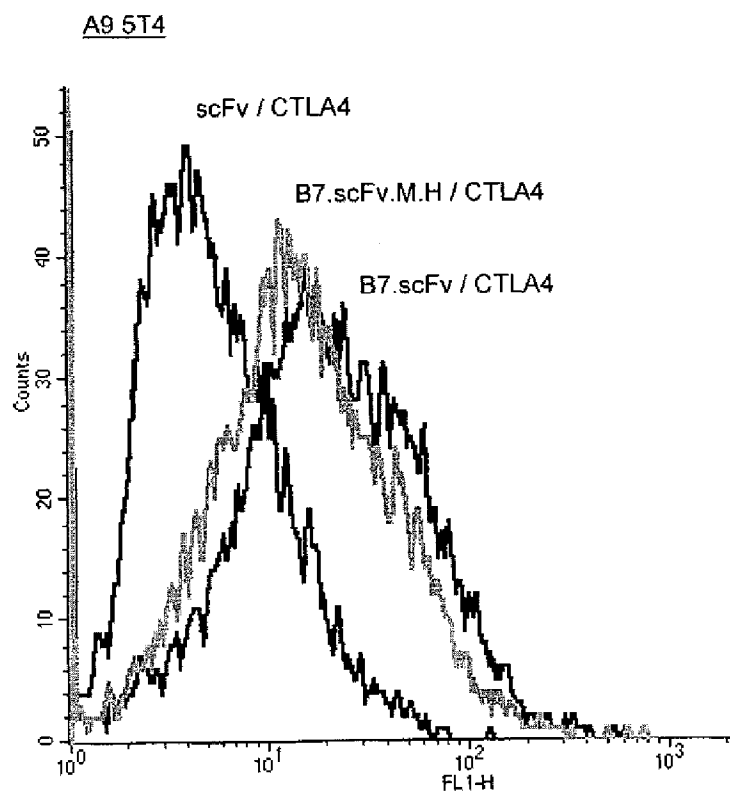


FIG. 14

FIG. 15



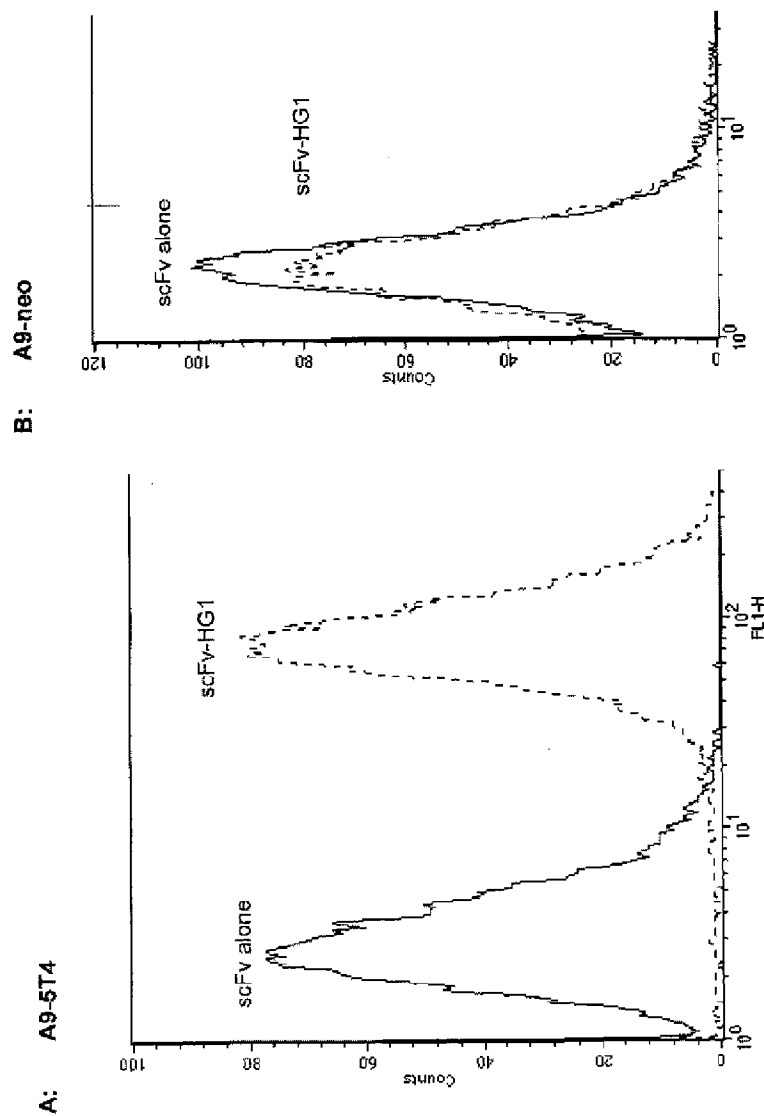


FIG. 16

FIG. 17

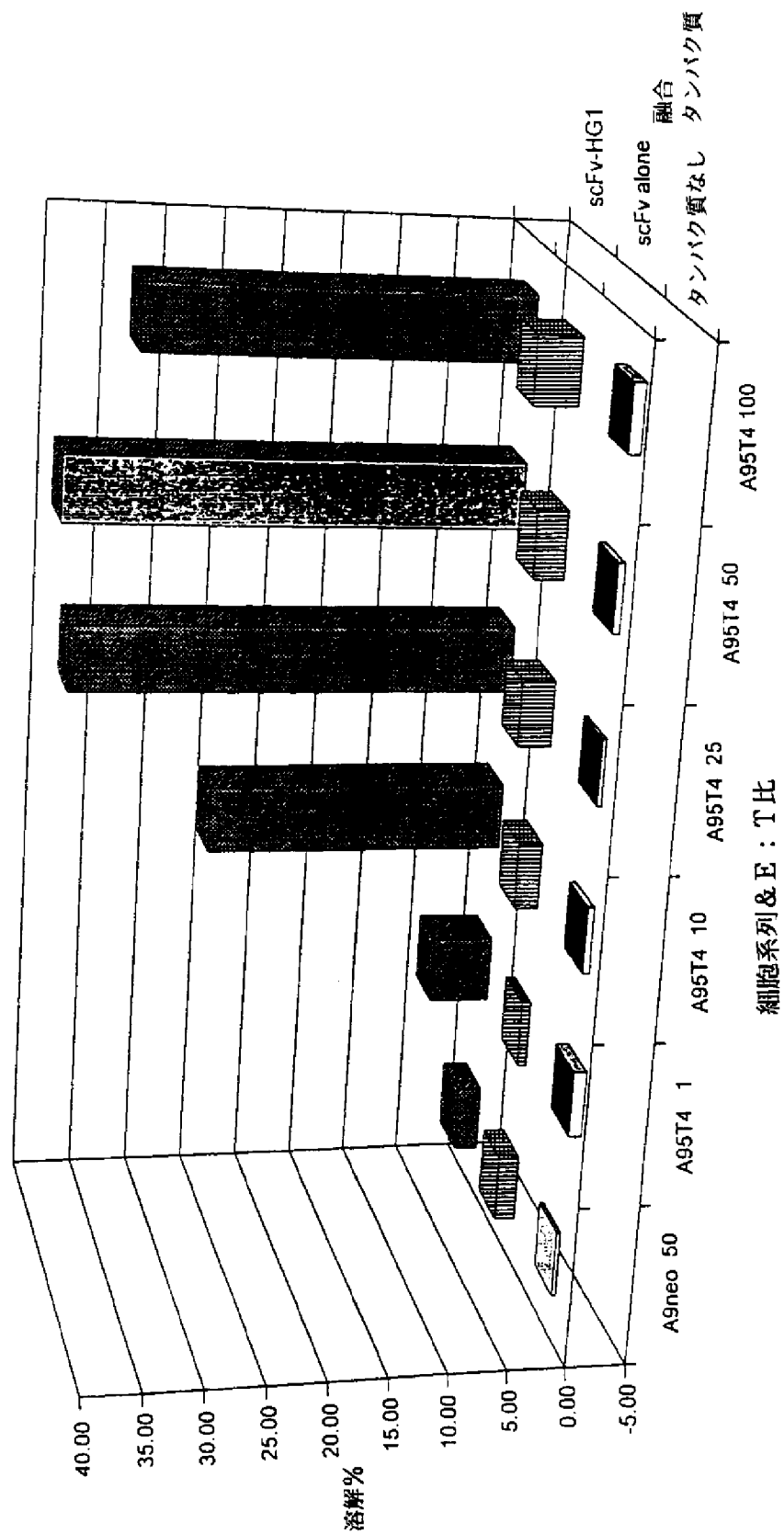


FIG. 18

pONY8.1SM

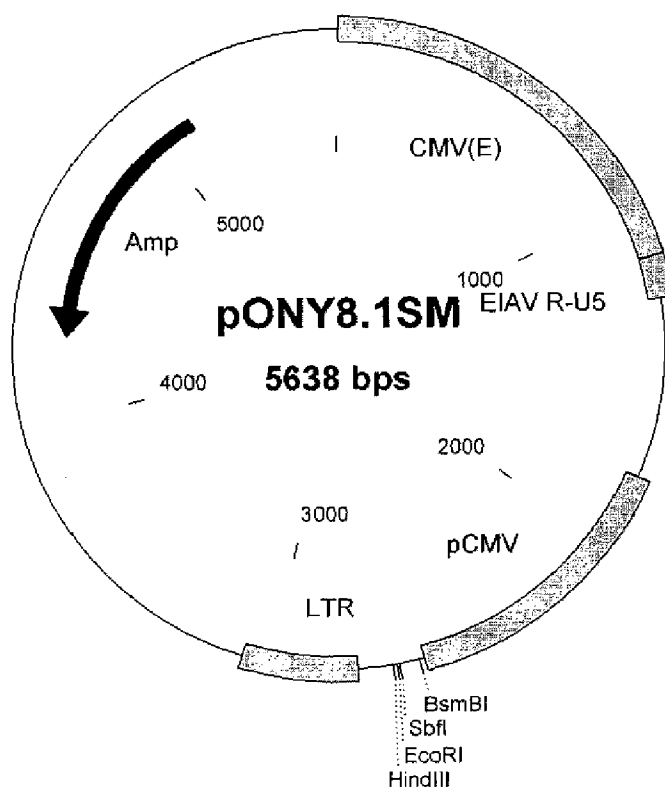
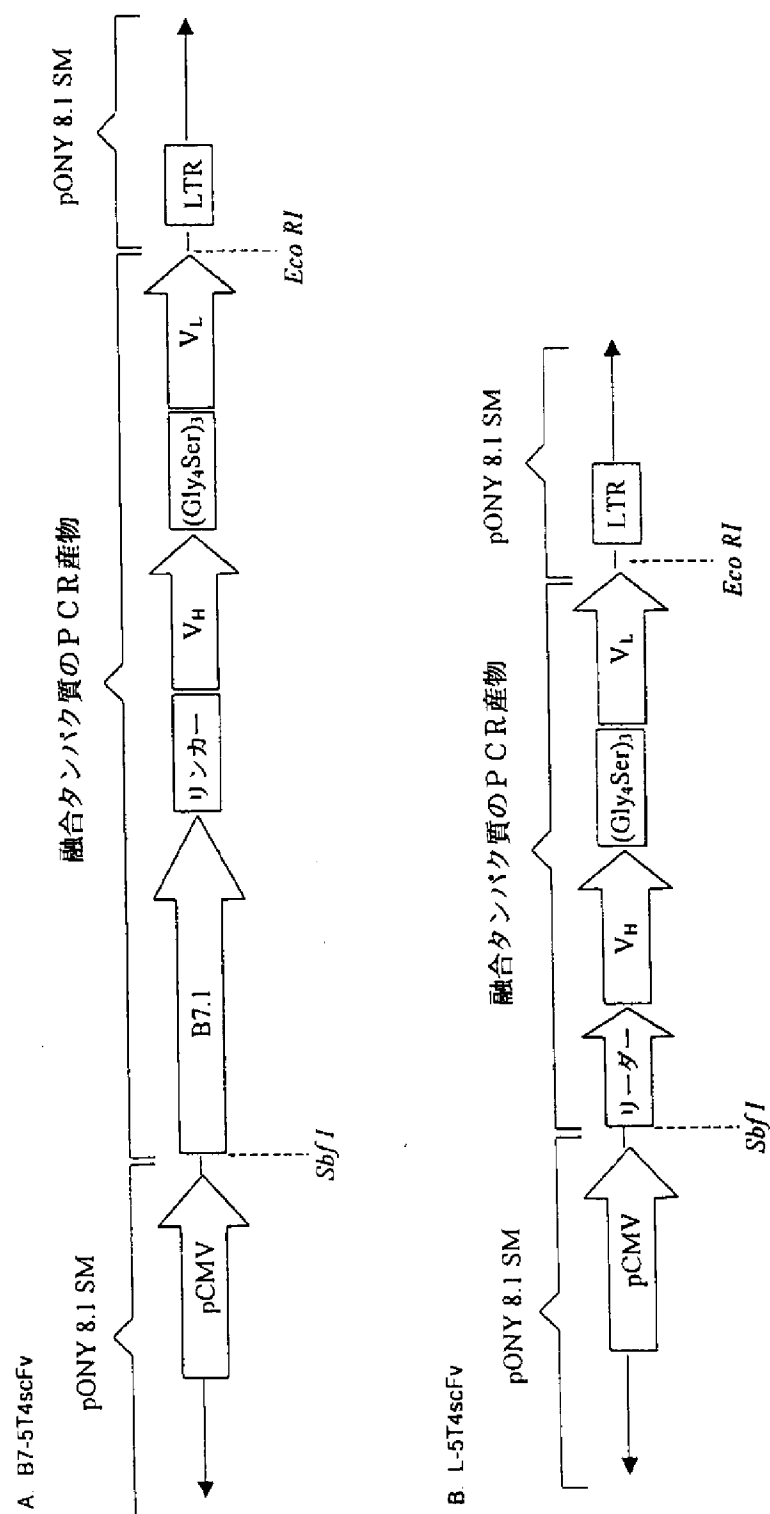


FIG. 19
pONY 8.1 SM中の融合タンパク質構築物



pBluescript II SK(pBSII)中のpLink-(Gly₄ Ser)₃リンカー-[illegible]

FIG. 21

pBS I I 注の s c F v および リーダー配列

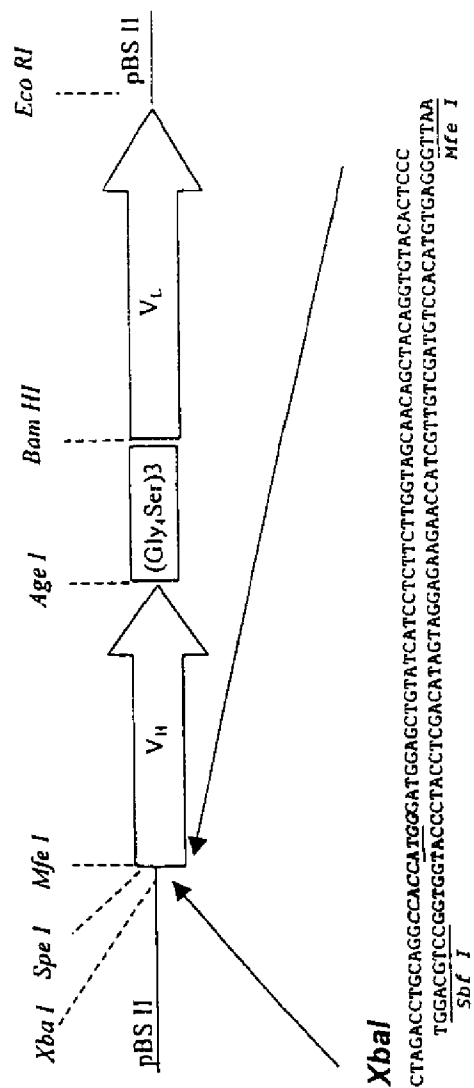


FIG. 22

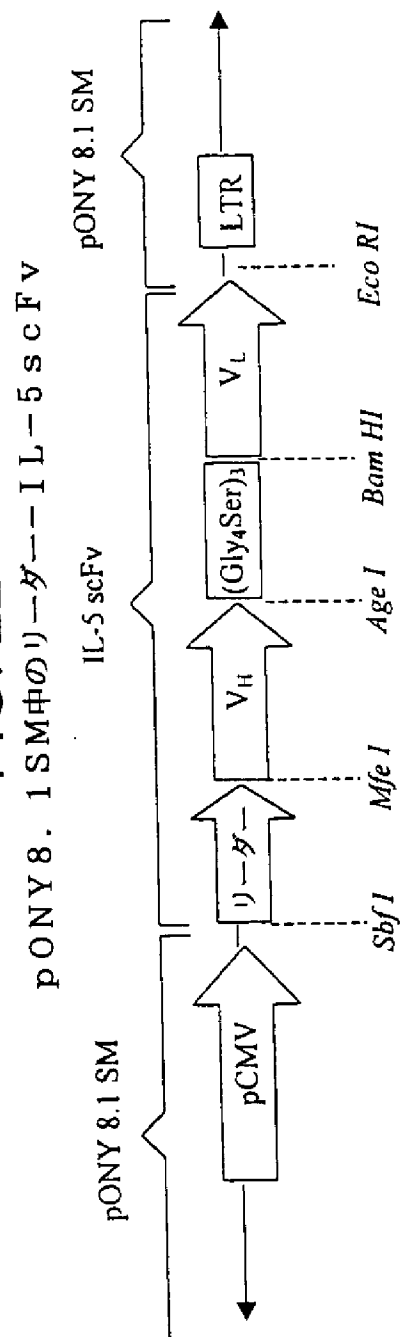


FIG. 23

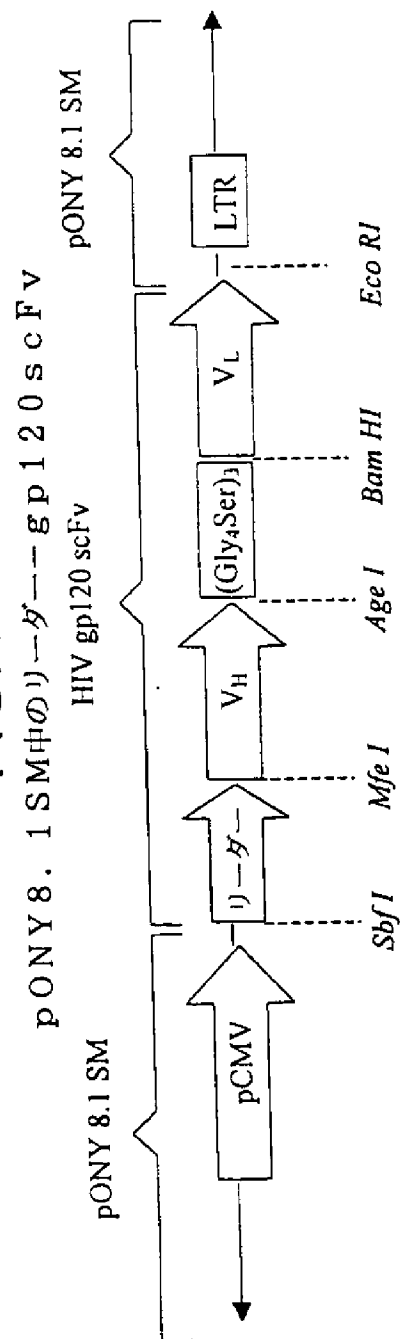


FIG. 24

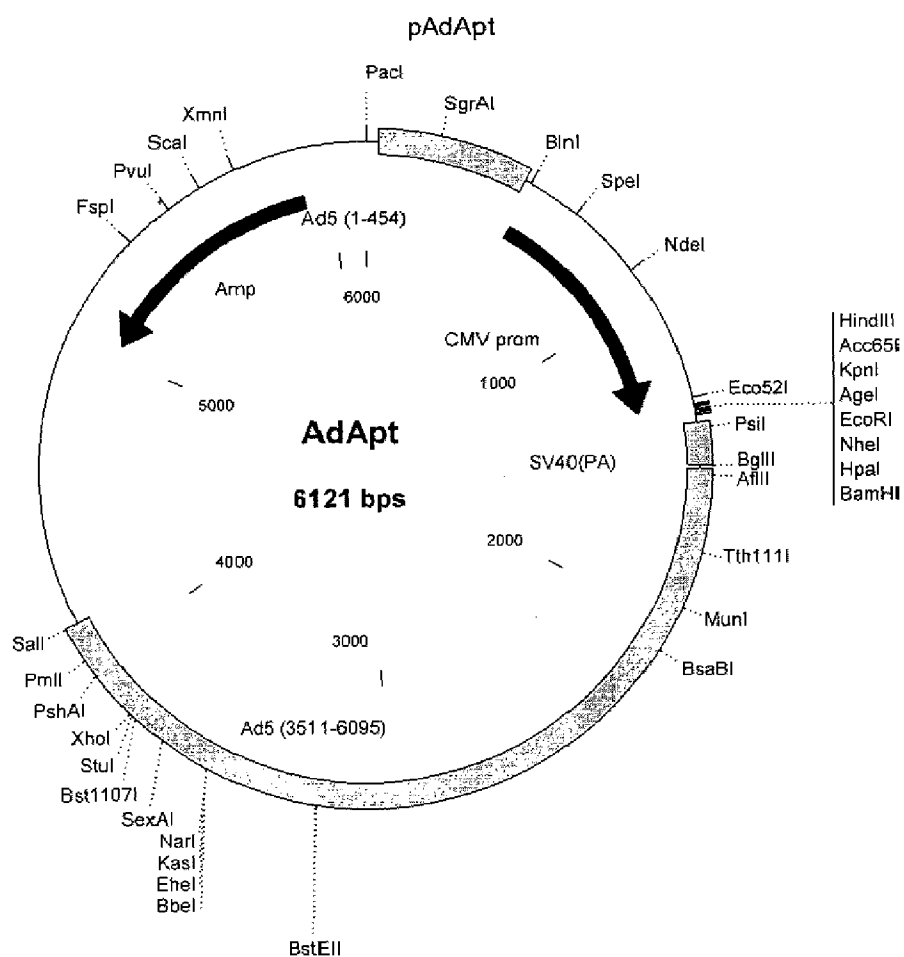


FIG. 25
pAdApt 中の融合タンパク質構築物

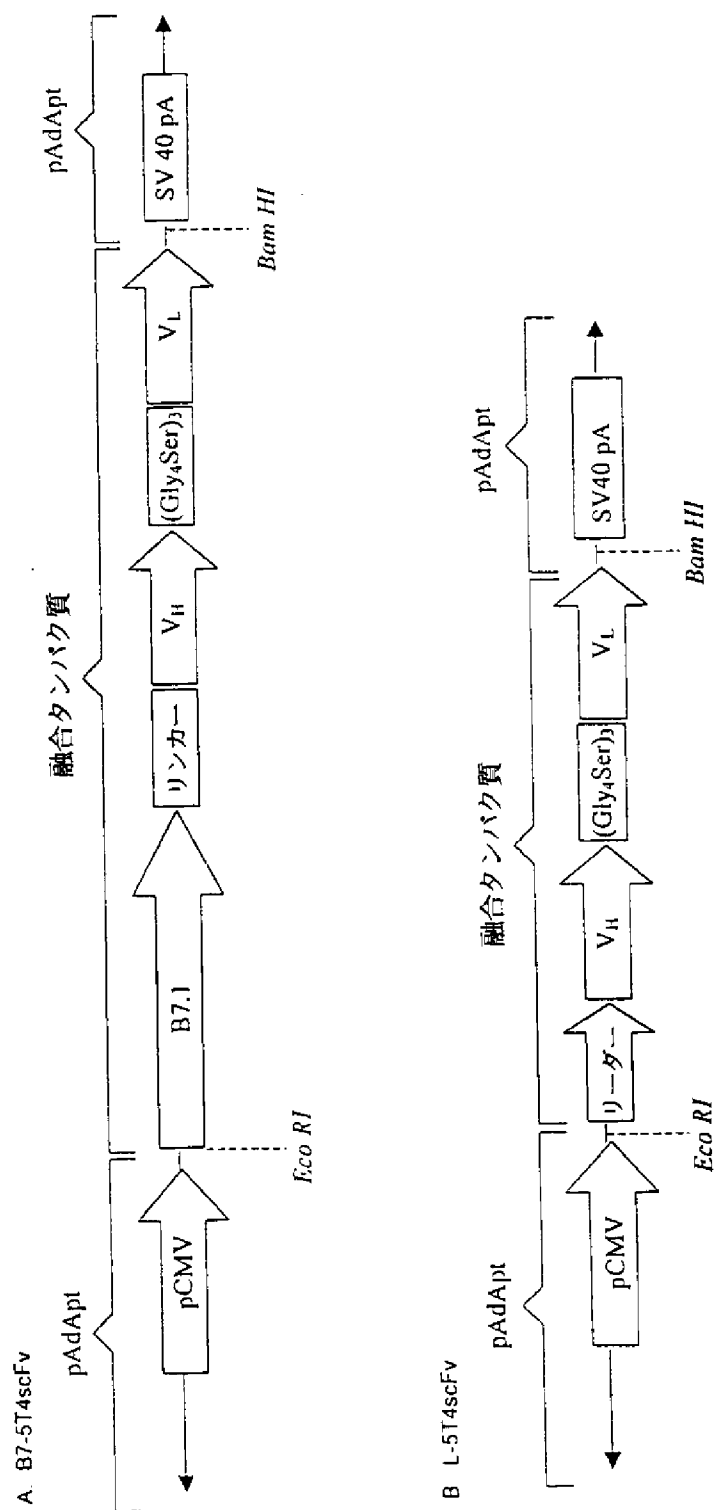


FIG. 26

イヌ 5 T 4 コード配列

```

ATGCCTGGGGGTGCTCCCGGGGCCCCGCCCGGGGACGGGCGGTTGCGGCTGGCGGGCTGGCGCTGGTGCTCCTGGG 80
M P G G C S R G P A A G D G R L R L A R L A L V L L

CTGGGTCTCCTCGTCTCGCTCACCTCCTGGGCGCCCTCCGCCCGCCTCCACGTCCGCCCGGGCCTCCGCGGCGTCCG 160
G W V S S S L T S W A P S A A A S T S P P A S A A S

CCCCGCCCCGGTGGCCGGCCAGTGCCCCAGCCTTGCGAGTGCTCGGAGGCGGCGCGCACGGTCAAGTGCGTTAACCGC 240
A P P P L P G Q C P Q P C E C S E A A R T V K C V N R

AACCTGACCGAGGTGCCCGCGGACCTGCCCCCTACGTGGCAACCTCTTCTCAGCGGCAACCAGCTGGCGGTGCTGCC 320
N L T E V P A D L P P Y V R N L F L T G N Q L A V L

CCCCGCGCCTTCGCCCGCGCGCGCGCGCTGGCGGAGCTGGCCGCGCTCAACCTGAGCGGCGAGCAGCCTGGCGGAGTGT 400
P P G A F A R R P P L A E L A A L N L S G S S L R E V

GCGCGGCGCCTTCGAGCACCTGCCGAGCCTGGCCGAGCTCGACCTCAGCCACAACCCGCTGGGCAACCTCAGCGCCTTC 480
C A G A F E H L P S L R Q L D L S H N P L G N L S A F

GCCTTCGCGGGCAGCGACGCGCAGCCGCTCGGGCCCCAGCCCCCTGGTGGAGCTGATGCTGAACCACATCGTCCCCCCGA 560
A F A G S D A S R S G P S P L V E L M L N H I V P P

CGACCGGCGGCAGAACCGGAGCTTCGAGGGCATGGTGGCGGTGCCCTCCGAGCGGGCGCGCGCTTCGCGGGCTGCAGT 640
O D R R Q N R S F E G M V A A A L R A G R A L R G L Q

GCCTGGAGCTGGCGGCAACCGCTTCTCTACTTGCCCTCGCGACGCTCCTGGCCAGCTACCCGGCCTCCGGCACCTGGAC 720
C L E L A G N R F L Y L P R D V L A Q L P G L R H L D

CTGCGCAACAACTCCCTGGTGAGCCTCACCTACGTGTCCTTCGCAACCTGACGCACTTGGAGAGCCTCCACCTGGAGGA 800
L R N N S L V S L T Y V S F R N L T H L E S L H L E

CAACGCCCTCAAGGTCCTTCACAACGCCACCTGGCGGAGCTGCAGAGCCTGCCCCACGTCCGGGTCTTCTGGACAACA 880
D N A L K V L H N A T L A E L Q S L P H V R V F L D N

ACCCCTGGGTCTGCGATTGTACATGGCAGACATGGTGGCCTGGCTCAAGGAGACAGAGTGGTGGCGGGCAAAGCCGGG 960
N P W V C D C H M A D M V A W L K E T E V V P G K A G

CTCACCTGTGCATTCCCGGAGAAAATGAGGAATCGGGCCCTCTTGGAACCTCAACAGCTCCACCTGGACTGTGACCCTAT 1040
L T C A F P E K M R N R A L L E L N S S H L D C D P

CCTCCCTCCATCCCTGCAGACTTCTTATGTCTTCTAGGTATTGTCTTAGCCCTGATAGCGCCATCTTCTACTGCTTT 1120
I L P P S L Q T S Y V F L G I V L A L I G A I F L L V

TGATTTGAACCGCAAGGGGATAAAGAAGTGGATGCATAACATCAGAGATGCCTGCAGGGATCACATGGAAGGGTATCAC 1200
L Y L N R K G I K K W M H N I R D A C R D H M E G Y H

TACAGATACGAAATCAATGCAGACCCAGGTTAACAAACCTCAGTTCCAATTGGATGTCTGA 1263
Y R Y E I N A D P R L T N L S S N S D V .

```

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/30 A61K39/395 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

H. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

Y Patent family members are listed in annex.

^a Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earliest document but published on or after the international filing date
- *I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "1" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other prior documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2001

Date of mailing of the international search report

13.07.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nichogiannopoulou, A

I. INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 00/04317

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JACKSON ET AL: "Antigen specificity and tumor targeting efficiency of a human carcinoembryonic antigen-specific scFv and affinity -matured derivatives" BRITISH JOURNAL OF CANCER, GB, LONDON, vol. 78, no. 2, July 1998 (1998-07), pages 181-188, XP002128798 ISSN: 0007-0920 the whole document	1-40
Y	OSBOURN J K ET AL: "GENERATION OF A PANEL OF RELATED HUMAN SCFV ANTIBODIES WITH HIGH AFFINITIES FOR HUMAN CEA" IMMUNOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 181-196, XP000645453 ISSN: 1380-2933 the whole document	1-40
Y	WO 89 07947 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 8 September 1989 (1989-09-08) the whole document	1-40
Y	WO 98 12227 A (DIAGNOCURE INC (CA)) 26 March 1998 (1998-03-26) the whole document	1-40
X	MYERS K A ET AL: "ISOLATION OF A CDNA ENCODING 5T4 ONCOFETAL TROPHOBLAST GLYCOPROTEIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 269, no. 12, 25 March 1994 (1994-03-25), pages 9319-9324, XP002064468 ISSN: 0021-9258 the whole document	41-44
X	DATABASE EMBL 'Online! AC No: AJ012159, 27 October 1998 (1998-10-27) MYERS KA ET AL: "Homo sapiens 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein" XP002170222 87.2% identity with 1263 nucleotides of SEQ ID No:14 abstract	41-44
P, X	WO 00 29428 A (CARROLL MILES WILLIAM; MYERS KEVIN ALAN (GB); OXFORD BIOMEDICAL LTD) 25 May 2000 (2000-05-25) page 27, line 18 -page 29, line 35	41-44

3

Form PCT/ISA/E10 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 00/04317**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 25, 32-34, 36-38 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 39
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-40

Use of an ScFv antibody against a disease associated molecule in therapy. Nucleotide and amino acid sequences, constructs, vectors, plasmids and host cells related to such ScFv antibodies. Processes and methods for preparing and obtaining such ScFv antibodies and pharmaceutical compositions comprising them.

2. Claims: 41-44

Canine ST4 tumour associated antigen, nucleotide sequences encoding it and antibodies against it

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 39

Claim 39 has not been searched due to the lack of an adequate technical definition of the claimed subject-matter. A definition of entities or processes merely with reference to the description and figures is not sufficient for a meaningful search to be carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on parent family members

International Application No

PCT/GB 00/04317

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9855607 A	10-12-1998	AU 7780198 A CN 1258319 T EP 1012259 A NO 995901 A	21-12-1998 28-06-2000 28-06-2000 04-02-2000
WO 9945126 A	10-09-1999	AU 3266899 A AU 3267099 A EP 1068338 A WO 9945127 A	20-09-1999 20-09-1999 17-01-2001 10-09-1999
WO 9742329 A	13-11-1997	AU 719513 B AU 2645597 A BR 9708910 A CA 2250579 A CN 1217750 A CZ 9803536 A EP 0896626 A HU 9901562 A JP 2000510692 T NO 985120 A PL 329871 A SK 150298 A TR 9802227 T	11-05-2000 26-11-1997 03-08-1999 13-11-1997 26-05-1999 17-02-1999 17-02-1999 30-08-1999 22-08-2000 29-12-1998 12-04-1999 13-04-1999 21-07-2000
WO 8907947 A	08-09-1989	AT 123652 T AU 3353989 A DE 68923027 D EP 0336562 A EP 0403559 A IE 72089 L US 5869053 A ZA 8901686 A	15-06-1995 22-09-1989 20-07-1995 11-10-1989 27-12-1990 04-09-1989 09-02-1999 29-11-1989
WO 9812227 A	26-03-1998	AU 4373197 A	14-04-1998
WO 0029428 A	25-05-2000	AU 1394900 A EP 1036091 A GB 2347932 A	05-06-2000 20-09-2000 20-09-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
	16/18	1/19	
C 1 2 N	1/15	1/21	
	1/19	C 1 2 P 21/08	
	1/21	G 0 1 N 33/15	Z
	5/10	33/50	Z
C 1 2 P	21/08	33/53	N
G 0 1 N	33/15		S
	33/50	33/566	
	33/53	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
	33/566	A 6 1 K 37/48	
(31)優先権主張番号	0 0 0 5 0 7 1 . 6		
(32)優先日	平成12年3月2日(2000. 3. 2)		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	キングズマン, アラン		
	イギリス国、オーエックス4 4ジーエイ		
	オックスフォード、ジ・オックスフォー		
	ド・サイエンス・パーク、ロバート・ロビ		
	ンソン・アヴェニュー、メダワー・センタ		
	ー、オックスフォード・バイオメディカ		
	(ユーケイ・) リミテッド		

- (72)発明者 キングズマン, スーザン・メアリ
イギリス国、オーエックス4 4ジーエイ
オックスフォード、ジ・オックスフォー
ド・サイエンス・パーク、ロバート・ロビ
ンソン・アヴェニュー、メダワー・センタ
ー、オックスフォード・バイオメディカ
(ユーケイ・) リミテッド
- (72)発明者 ベビントン, クリストファー・ロバート
アメリカ合衆国カリフォルニア州94080、
サウス・サンフランシスコ、ゲイトウェ
イ・ブールヴァード 600、コウルター・
ファーマシューティカル・インコーポレイ
テッド
- (72)発明者 キャロル, マイルズ・ウィリアム
イギリス国、オーエックス4 4ジーエイ
オックスフォード、ジ・オックスフォー
ド・サイエンス・パーク、ロバート・ロビ
ンソン・アヴェニュー、メダワー・センタ
ー、オックスフォード・バイオメディカ
(ユーケイ・) リミテッド
- (72)発明者 エラード, フィオナ・マーガレット
イギリス国、オーエックス4 4ジーエイ
オックスフォード、ジ・オックスフォー
ド・サイエンス・パーク、ロバート・ロビ
ンソン・アヴェニュー、メダワー・センタ
ー、オックスフォード・バイオメディカ
(ユーケイ・) リミテッド
- (72)発明者 マイヤーズ, ケヴィン・アラン
イギリス国、オーエックス4 4ジーエイ
オックスフォード、ジ・オックスフォー
ド・サイエンス・パーク、ロバート・ロビ
ンソン・アヴェニュー、メダワー・センタ
ー、オックスフォード・バイオメディカ
(ユーケイ・) リミテッド

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB14 BB50
BB51 CB01 CB02 DA13 DA36
FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA45 CA04 CA07
DA02 DA05 DA11 EA02 EA03
EA04 FA02 GA11 HA01 HA03
HA11
4B064 AG01 AG27 CA01 CA10 CA19
CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y
AB01 AB02 BA01 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA13 AA16 DA32 DC01
NA14 NA15 ZB26
4C085 AA14 AA27 EE06
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA76 DA86 EA20
EA50 FA72 FA74